

Klinik und Poliklinik der Inneren Medizin I
der Universität Regensburg
Leiter: Prof. Dr. R. H. Straub

Hormonale und neuronale Veränderungen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades *Dr. oec. troph.*
im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl. oec. troph. Claudia Weidler

aus Nürnberg

Regensburg im Februar 2005

Promotionsgesuch eingereicht am:

09.02.2005

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. med. K. Becker-Brandenburg, Institut für Ernährungswissenschaft
und

Prof. Dr. med. R. H. Straub, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

Gutachter

1. Gutachter (1. Prüfer):	Prof. Dr. med. K. Becker-Brandenburg
2. Gutachter (2. Prüfer):	Prof. Dr. med. R. H. Straub

Meinen Eltern

„Eine wissenschaftliche Entdeckung ist nie die Arbeit von nur einer Person.“

Louis Pasteur (1822-1895)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Rheumatoide Arthritis	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	2
1.1.2 Pathogenese und Chronizität	2
1.2 Weitere Erkrankungen des Bindegewebes	3
1.3 Synthese und Metabolismus der Steroidhormone	5
1.3.1 Adrenale Steroidhormone	5
1.3.2 Die Regulation der adrenalen Steroidhormonsynthese	7
1.3.3 Gonadale und peripher gebildete Steroidhormone	8
1.3.4 Zirkulation und Metabolismus der Steroidhormone	11
1.4 Biologische Effekte der Steroidhormone und deren Veränderung bei der rheumatoiden Arthritis	14
1.4.1 Kortisol	14
1.4.2 DHEAS und DHEA	16
1.4.3 Gonadale und peripher gebildete Geschlechtshormone	19
1.4.4 Steroidhormonrezeptoren	22
1.5 Neuronale Veränderungen bei der rheumatoiden Arthritis	23
1.5.1 Das sensorische Nervensystem	23
1.5.2 Das sympathische Nervensystem	24
1.5.3 Nerven-abstoßende Faktoren und Nervenwachstumsfaktoren	27
1.6 Zielsetzung der Arbeit	29
1.6.1 Hormonale Veränderungen	29
1.6.2 Neuronale Veränderungen	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Tabellarische Zusammenfassung der angewandten Methoden	31
2.2 Patienten und Patientenmaterial	32

2.3	Histologie	33
2.4	Superfusion	35
2.5	Bestimmung der Zytokin- und Hormonkonzentrationen im Superfusat und Urin	35
2.6	Zellisolation und Zellkultur	36
2.7	Bioassays	36
2.8	Steroidkonversionen	37
2.9	Statistische Auswertung der Daten	38
2.10	Eigener Arbeitsanteil an den verschiedenen Manuskripten	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Hormonale Veränderungen	41
3.1.1	Steroidkonversion durch die 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase	41
3.1.2	Steroidkonversion durch die Dehydroepiandrosteron-sulfatsulfatase	43
3.1.3	Steroidhormonmetabolite im Urin	45
3.2	Neuronale Veränderungen	46
3.2.1	Sensorische und sympathische Nervenfaserdichte bei gesunden Kontrollen	46
3.2.2	Der <i>Brain derived neurotrophic factor</i> und die Innervation im Synovialgewebe	47
3.2.3	Sympathische und sensible Nervenfaserdichte bei anderen chronischen Erkrankungen des Bindegewebes: Achillodynie und Morbus Dupuytren	47
4	Diskussion	49
4.1	Hormonale Veränderungen	49
4.2	Neuronale Veränderungen	55
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	62

7 Anhang

7.1 Die der Dissertation zugrundeliegenden veröffentlichten Originalarbeiten

7.2 Weitere Publikationen

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1: Biosynthese des Kortisols
- Abb. 2: Biosynthese der adrenalen Androgene
- Abb. 3: Schematische Darstellung der Produktion gonadaler und adrenaler Geschlechtshormone bei Männern und prämenopausalen Frauen
- Abb. 4: Steroidhormonsynthese in den Gonaden und peripheren Geweben
- Abb. 5: Die bidirektionale Reaktion der 11 β HSD
-
- Tab. 1: Kriterien der RA
- Tab. 2: Gesamtsteroidhormonkonzentrationen im Serum von Männern im Alter von 30-50 bzw. 60-80 Jahren sowie von Frauen vor und nach der Menopause
- Tab. 3: Tabellarische Zusammenfassung der angewandten Methoden
- Tab. 4: Übersicht über die immunhistologischen Methoden
- Tab. 5: Übersicht der verwendeten ELISA-Kits
- Tab. 6: Verwendete Substanzen für die Steroidkonversionen

Abkürzungsverzeichnis

11 β HSD 1	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1
11 β HSD 2	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2
ACTH	Adrenokortikotropin
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
CBG	Kortikosteroid-bindendes-Globulin
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GnRH	= LHRH, <i>Gonadotropin-Releasing-Hormone</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
LH	luteinisierendes Hormon
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NF κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
OA	Osteoarthritis
RA	rheumatoide Arthritis
SLE	systemischer Lupus erythematosus
SP	Substanz P
STS	Steroidsulfatase
TH	Tyrosinhydroxylase
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche systemische Autoimmunerkrankung mit unklarer Genese, die sich hauptsächlich in den Gelenken manifestiert. Die besonderen Merkmale sind dabei die chronische, symmetrische Entzündung der Synovialis, wobei vor allem periphere Gelenke wie Finger-, Knie-, Hand- und Sprunggelenke betroffen sind. Die RA kann von einem milden, oligoartikulären Verlauf bis hin zu einer sehr aggressiven Form der Polyarthritis reichen, welche mit einer raschen Zerstörung der Gelenke einhergeht. Neben den Gelenken können – als systemische Erkrankung – auch weitere Organe wie zum Beispiel Augen, Blutgefäße oder innere Organe betroffen sein. Es existiert keine klare Definition der RA, da weder ein klinischer noch ein Laborparameter ausreicht, um diese Erkrankung zu definieren. Meist werden jedoch die Kriterien des American College of Rheumatology herangezogen, die eine Kombination klinischer und radiologischer Untersuchungen darstellen. Auch Laborwerte werden zur weiteren Definition verwendet (siehe Tabelle 1). Für die Diagnose einer RA müssen vier der sieben Kriterien zutreffen (Sangha, 2000; Arnett et al., 1988).

Tab. 1: Kriterien der RA (nach Arnett et al., 1988)

Kriterium	Kommentare
Morgensteifigkeit	> 1h, > 6 Wochen
Arthritis an 3 oder mehr Gelenkregionen	Kapselschwellung, > 6 Wochen
Arthritis an Hand- oder Fingergelenken	> 6 Wochen
Symmetrische Arthritis	≥ ein Gelenk, > 6 Wochen
Rheumaknoten	vorhanden
Rheumafaktornachweis	positiv
Radiologische Veränderungen	Gelenknahe Osteoporose und/oder Erosionen

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die RA ist eine weltweit verbreitete Krankheit mit einer Prävalenz von etwa 0.5-1 %, die in allen ethnischen Bevölkerungsgruppen vorkommt (Harney und Wordsworth, 2002). Dabei sind Frauen häufiger betroffen als Männer (Silman und Pearson, 2002). Während bei Frauen die Inzidenz im Alter ansteigt und im Alter von 45-55 Jahren (Menopause) am höchsten ist, erkranken nur wenige Männer unter 45 Jahren an RA. Im Alter von 60-70 Jahren steigt jedoch die Wahrscheinlichkeit bei Männern an RA zu erkranken stark an und erreicht etwa die Inzidenz bei Frauen (Sangha, 2000; Wilder, 1996). Die Ursachen der RA konnten bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden. Mit Sicherheit kann man aber sagen, dass die RA polyätiologisch bedingt ist, wobei die Beteiligung genetischer Faktoren, Infektionen und autoimmuner Reaktionen gesichert ist. Obwohl einige epidemiologische Studien eine familiäre Prädisposition für das Auftreten einer RA zeigen, ist das Vorhandensein des MHC Klasse II-Moleküls HLA-DRB1*0401 mit einem erhöhten Risiko verbunden, an RA zu erkranken. Weiterhin gibt es Zusammenhänge zwischen der Nachweisbarkeit an HLA-DRB1*0101 und dem Auftreten der RA (Harney und Wordsworth, 2002; Sangha, 2000; Silman et al., 2002). Neben genetischen Faktoren spielen auch Umweltfaktoren wie Infektionen bei der Entstehung der RA eine Rolle. Einen Einfluss auf die Manifestierung einer RA könnten dabei Antigene von Bakterien (Mykobakterien, Mykoplasmen, Escherichia coli) oder von Viren (Paroviren, Epstein-Barr-Virus, Retroviren) haben (Carty et al., 2003; Toivanen, 2001). Neben der Fremdeinwirkung von Bakterien oder Viren können auch autoimmune Reaktionen gegen Immunglobuline oder Kollagen ursächlich beteiligt sein (VanderBorgh, 2001).

1.1.2 Pathogenese und Chronizität

Obwohl das initiale Ereignis für die Entstehung der RA nicht vollständig geklärt ist, geht man jedoch davon aus, dass ein exogenes Antigen bei einem genetisch empfindlichen Individuum eine Stimulation der T-Zellen bewirkt. Die Folge ist ein Anlocken und die Aktivierung von Entzündungszellen wie B-Zellen und Monozyten ins Synovialgewebe. Auch die Synoviozyten vom Typ A (makrophagenähnlich) und Typ B (fibroblastenähnlich) werden aktiviert. Beide Prozesse werden durch Zytokine wie $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 vermittelt.

Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer gesteigerten Zellproliferation und es bildet sich ein Pannusgewebe. Diese sogenannten Pannozyten (Fibroblasten) führen durch die Freisetzung von Metalloproteinasen zu einer Destruktion des umliegenden Gewebes wie Knorpel und Knochen. Chondrozyten und Osteoklasten sind ebenfalls am Abbau des Gewebes beteiligt. Aktivierte Chondrozyten zeigen eine verminderte Synthesefähigkeit sowie einen gesteigerten enzymatischen Abbau der Matrix. Die Stimulation der Osteoklasten führt letztlich zu einer gesteigerten Knochenresorption mit der Folge einer lokalen Osteoporose (Müller-Ladner et al.; 2000, Ritchlin, 2004). Welche Mechanismen schließlich zu einer Chronifizierung der Erkrankung führen, ist unbekannt.

1.2 Weitere Erkrankungen des Bindegewebes

In diesem Kapitel werden weitere Erkrankungen des Bindegewebes besprochen, die in den Manuskripten vorkommen: systemischer Lupus erythematosus (SLE), Osteoarthritis (OA), Achillodynie und Morbus Dupuytren.

Der **SLE** ist wie die RA eine systemische chronische Autoimmunerkrankung an der hauptsächlich Frauen erkranken. Bei der Ätiogenese spielen dabei eine genetische Prädisposition, exogene Faktoren (UV-Licht, Infektionen, Medikamente) sowie Veränderungen im Hormonsystem (erhöhte Östrogen- vs. erniedrigten Androgenspiegeln) eine Rolle. Der SLE manifestiert sich im Blutgefäßsystem und im Bindegewebe. Dabei sind hauptsächlich Haut, Gelenke und Niere betroffen. Autoantikörper, die meist gegen Zellkernbestandteile gerichtet sind, binden an die Basalmembran der Niere oder lagern sich in Form von Immunkomplexen in der Niere ab. Die Folge ist die Aktivierung des Komplementsystems sowie eine Stimulation der T- und B-Zellen. Durch eine gestörte Immunantwort und einen defekten Abbau apoptotischer Zellen führt diese Entzündung zu einer Glomerulonephritis und letztlich zu einer Niereninsuffizienz (Mok und Lau, 2003). Die Diagnose des SLE erfolgt über die Kriterien des American College of Rheumatology, welche unter anderem neurologische, hämatologische und renale Merkmale sowie das Vorhandensein von Photosensitivität, antinukleärer Antikörpern und einer Arthritis beinhalten (Tan et al, 1982).

Bei der **OA** handelt es sich um eine degenerative Gelenkerkrankung mit fortschreitender Knorpel- und Knochendestruktion. Es findet aber auch eine Knorpel- und Knochenneubildung statt. Die Ursachen für die Entstehung einer OA sind unbekannt. Vermutet werden biomechanische und biochemische Veränderungen im Knorpel und im subchondralen Knochengewebe. Im Gegensatz zur RA liegt bei der OA der Ursprung der entzündlichen Veränderung nicht im Synovialgewebe, weshalb diese Patienten oft als Kontrollgruppe herangezogen werden. Die OA betrifft vor allem die Hüft- und Kniegelenke sowie die Wirbelsäule. Die Kriterien zur Klassifizierung der Erkrankung sind uneinheitlich, meist erfolgt die Diagnose durch eine Kombination von radiologischen und klinischen (Schmerz, funktionelle Einschränkung) Untersuchungen. Wie bei der RA sind bei der OA Frauen häufiger betroffen und die Wahrscheinlichkeit an OA zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter. Ein weiterer Risikofaktor für die OA ist das Übergewicht (Sangha, 2000).

Die **Achillodynie** ist eine schmerzhafte degenerative Veränderung der Achillessehne, bei der es oft auch zur Verdickungen der Sehne kommt. Häufig davon betroffen sind Sportler. Die Erkrankung kann aber auch bei Menschen ohne sportliche Überlastung der Achillessehne auftreten (Rolf und Movin, 1997). Über die Pathogenese ist wenig bekannt. Histologische Befunde einer chronischen Achillodynie zeigen eine veränderte Sehnenstruktur und einen erhöhten Anteil an Extrazellulärmatrix. Außerdem findet man einen Anstieg an Glykosaminoglykanen und Blutgefäßen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Movin et al., 1997).

Beim **Morbus Dupuytren** – auch Palmaraponeurose genannt – handelt es sich um eine strangartige Verdickung des Faszien­gewebes der Hand. Dabei kommt es zur Verkürzung des Gewebes und es entsteht die typische Hohlhand. Es können aber auch die Finger von dieser Erkrankung betroffen sein. Das gehäufte familiäre Auftreten sowie die Tatsache, dass der Morbus Dupuytren vor allem bei hellhäutigen Männern nordeuropäischen Ursprungs vorkommt, lässt eine erbliche Komponente vermuten (Brenner et al., 2001). Weitere Ursachen für die Entstehung eines Morbus Dupuytren sind unbekannt. Die Histologie zeigt eine vermehrte Proliferation von Fibroblasten mit einer erhöhten Produktion von Kollagen (vor allem Typ III Kollagen) und Proteoglykanen (Brickley et al., 1981; Flint et al., 1982; Mohr und Vossbeck,

1985). Auch Entzündungszellen sind im Faszien­gewebe von Patienten mit Morbus Dupuytren nachgewiesen worden (Baird et al., 1993a; Gudmundsson et al., 1998; Qureshi et al., 2001).

1.3 Synthese und Metabolismus der Steroidhormone

Die auffallende Häufung des weiblichen Geschlechtes bei einigen der genannten Erkrankungen lässt eine Beteiligung der Geschlechtshormone in der Pathogenese vermuten. In diesem Kapitel wird nun die Synthese und der Metabolismus der Steroidhormone beschrieben. Während die Produktion von Kortisol und der androgenen Vorläuferhormone Dehydroepiandrosteron (DHEA) und dessen Sulfat (DHEAS) in der Nebennierenrinde abläuft, synthetisieren neben den Gonaden auch periphere Gewebe aus DHEAS und DHEA aktive Steroidhormone wie Testosteron und 17β -Östradiol. Der Ausgangspunkt aller Steroidhormone ist jedoch das Cholesterol. Es wird in den Mitochondrien durch das Enzym P450ssc (Cholesterol-20,22-desmolase) zu Pregnenolon konvertiert. Dieser Schritt involviert zwei Hydroxylierungen und das Abspalten der Seitenkette des Cholesterols. Pregnenolon wird nun aus den Mitochondrien heraus transportiert und steht für die Bildung weiterer Steroidhormone wie Aldosteron, Kortisol, DHEAS, Androgenen und Östrogenen zur Verfügung (Aron et al., 2004). Die Bildung der einzelnen Hormone, deren Bedeutung beim gesunden Erwachsenen sowie Veränderungen bei der RA werden in den folgenden Kapiteln genauer erläutert.

1.3.1 Adrenale Steroidhormone

Die adrenalen Steroidhormone werden in der Nebennierenrinde gebildet. Während in der äußeren Zone (zona glomerulosa) ausschließlich Aldosteron produziert wird, werden in den beiden inneren Zonen (zona fasciculata und zona reticularis) Kortisol, DHEA, DHEAS und eine geringe Menge an Androstendion synthetisiert. Für die Produktion des Kortisols wird das Pregnenolon im glatten Endoplasmatischen Retikulum durch das Enzym P450c17 zum 17α -Hydroxypregnenolon konvertiert. Mit Hilfe der 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase wird daraus das 17α -Hydroxyprogesteron

gebildet. Der nächste Schritt ist eine Hydroxylierung am C-Atom 21 durch das Enzym P450c21 zum 11-Desoxykortisol. Dieses Steroid wird nun wieder in das Mitochondrium transportiert, wo eine 11 β -Hydroxylierung in das Kortisol stattfindet. Ein alternativer Syntheseweg des Kortisols über das Progesteron ist ebenfalls in Abbildung 1 dargestellt.

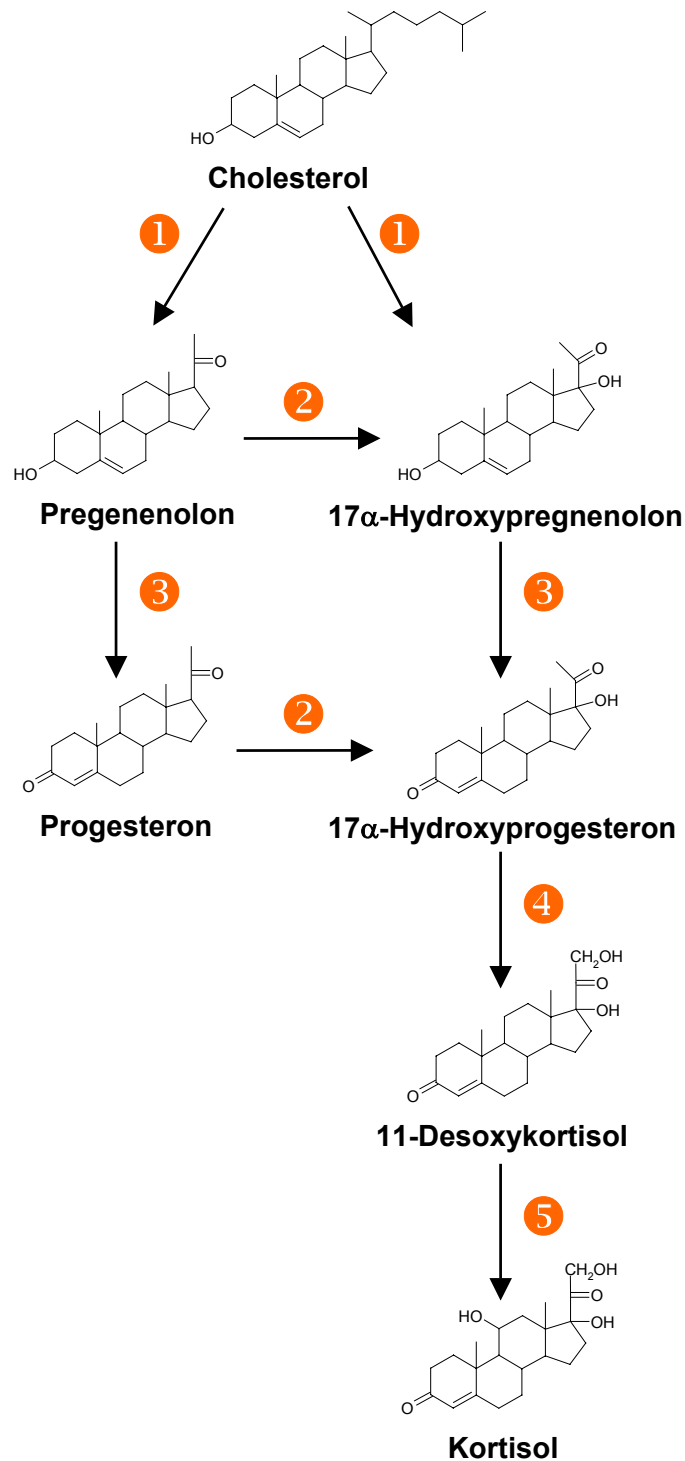


Abb. 1: Biosynthese des Kortisols. ❶ Cholesterol-20,22-desmolase; ❷ 17 α -Hydroxylase; ❸ 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase; ❹ 21-Hydroxylase; ❺ 11 β -Hydroxylase.

Die Produktion der adrenalen Androgene DHEA und Androstendion ausgehend von Pregnenolon und Progesteron findet im glatten Endoplasmatischen Retikulum statt und ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Beide Steroide werden mit Hilfe des Enzyms P450c17 zuerst am C-Atom 17 hydroxyliert und anschließend durch die Lyaseaktivität des gleichen Enzyms um zwei C-Atome verkürzt (Nakajin und Hall, 1980). Das entstandene DHEA wird durch die Steroidsulfotransferase sulfatiert. Das DHEAS stellt neben dem Kortisol das Hauptprodukt der Nebennierenrinde dar. Alle drei Androgene (Androstendion, DHEA und DHEAS) werden in den Blutkreislauf abgegeben und gelangen so zu den Zielgeweben, wo sie zu aktiven Steroidhormonen umgewandelt werden (Aron et al., 2004).

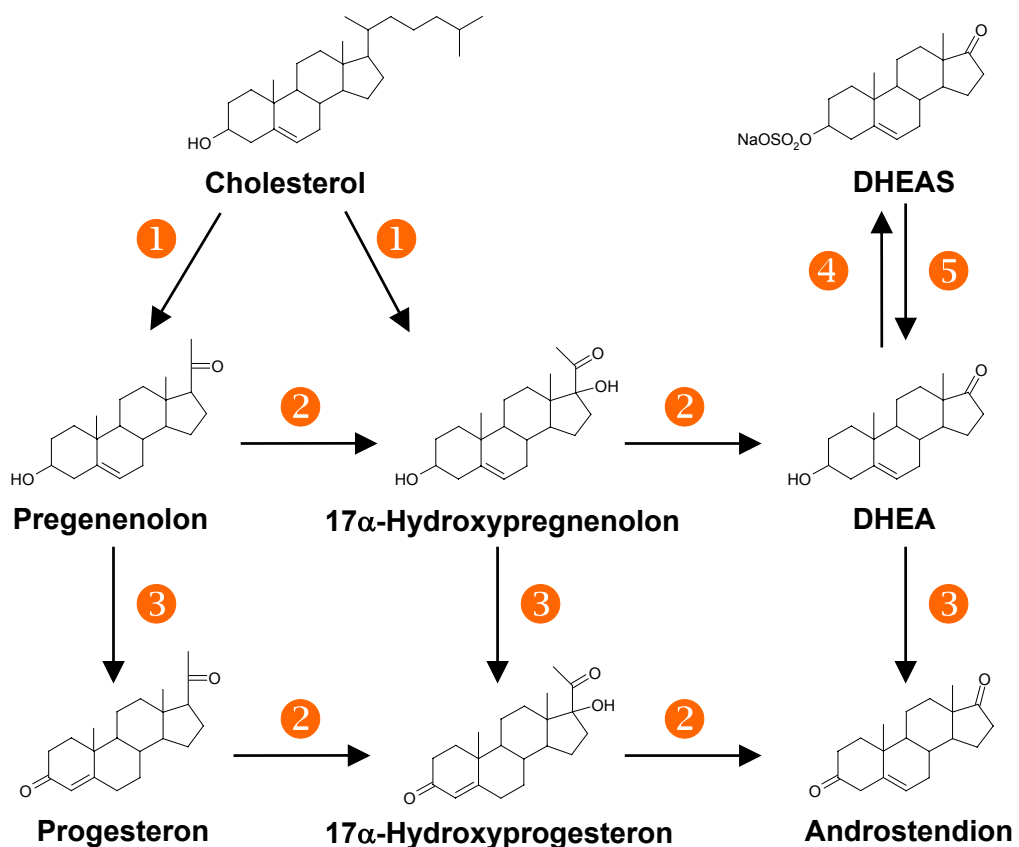


Abb. 2: Biosynthese der adrenalen Androgene. ❶ Cholesterol-20,22-desmolase; ❷ 17α-Hydroxylase, 17,20-Lyase; ❸ 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase; ❹ Steroidsulfotransferase; ❺ Steroidsulfatase.

1.3.2 Die Regulation der adrenalen Steroidhormonsynthese

Die Freisetzung von Kortisol und den Steroiden DHEAS und DHEA aus der Nebennierenrinde wird zentral durch das *Corticotropin-Releasing-Hormone* (CRH) reguliert. Das vom Hypothalamus freigesetzte CRH löst im Hypophysenvorderlappen die Sekretion des Adrenokortikotropen Hormons (ACTH) aus. Dieses erreicht die Nebennierenrinde und bewirkt dort eine vermehrte Steroidhormonausschüttung und -synthese. Letzteres geschieht durch eine vermehrte Lipoproteinaufnahme in die Zellen der Nebennierenrinde sowie durch eine gesteigerte Cholesterolesterase- und eine verminderte Cholesterolestersynthetaseaktivität. Da die Verfügbarkeit an freiem Cholesterol der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der adrenalen Steroidhormonproduktion ist, wird somit die Steroidhormonsynthese initiiert. Die negative Rückkopplung dieses sogenannten hypothalamo-hypophyseal-adrenalen Regelkreises zum Hypothalamus und zur Hypophyse geschieht durch das Kortisol. Wie CRH und ACTH wird auch Kortisol episodisch sezerniert und unterliegt einem zirkadianen Rhythmus. Die Kortisolsekretion ist morgens am höchsten und sinkt im Laufe des Tages ab. Weiterhin wird Kortisol nach Mahlzeiten, physischer Aktivität und Stress ausgeschüttet. Auch die Sekretion von DHEA und Androstendion folgen einer zirkadianen Periodizität. DHEAS unterliegt auf Grund seiner langsamen Metabolisierung keinem diurnalen Rhythmus (Aron et al., 2004).

Die adrenale Produktion der Vorläuferhormone DHEAS und DHEA ist stark alters- und geschlechtsabhängig. Die höchsten Serumkonzentrationen an DHEAS werden bei beiden Geschlechtern im zweiten bis dritten Lebensjahrzehnt erreicht und sinken ab diesem Zeitpunkt stetig ab. Bei Frauen ist die Konzentration an DHEAS in jedem Altersabschnitt geringer als bei Männern. Auffallend ist jedoch der ausgeprägtere Abfall dieses Hormons bei Männern (auf ein Siebtel des Maximums) als bei Frauen (auf ein Fünftel des Maximums) (Orentreich et al., 1984). Auch die adrenalen Androgene DHEA und Androstendion sinken im Serum im Alter von 40 bis 80 Jahren bei Männern um etwa 60% (Bélanger et al., 1994).

1.3.3 Gonadale und peripher gebildete Steroidhormone

Wie die Abbildung 3 zeigt, können die aktiven Geschlechtshormone sowohl in den Gonaden (Ovarien und Hoden) als auch lokal in den Zielzellen selbst aus den adrenalen Vorläufersteroidhormonen DHEAS und DHEA synthetisiert werden. Die Kontrolle der Produktion gonadaler Steroidhormone unterliegt ähnlich der adrenalen Produktion der hypothalamo-hypophysären-gonadalen Achse. Das *Gonadotropin-Releasing-Hormone* (GnRH=LHRH) aus dem Hypothalamus stimuliert die Freisetzung des luteinisierenden Hormons (LH) aus der Hypophyse. Dieses wiederum führt in der Nebenniere zu einer Erhöhung der Cholesterolkonzentration und somit zur Synthese gonadaler Hormone wie Testosteron und 17β -Östradiol. Die negative Rückkopplung zur Hypophyse und zum Hypothalamus geschieht durch die gebildeten Androgene und Östrogene. Bei der Frau hat zusätzlich das Follikel stimulierende Hormon (FSH) der Hypophyse einen stimulierenden Effekt auf die Progesteron- und Östrogensynthese. (Braunstein, 2004; Rosen und Cedars, 2004).

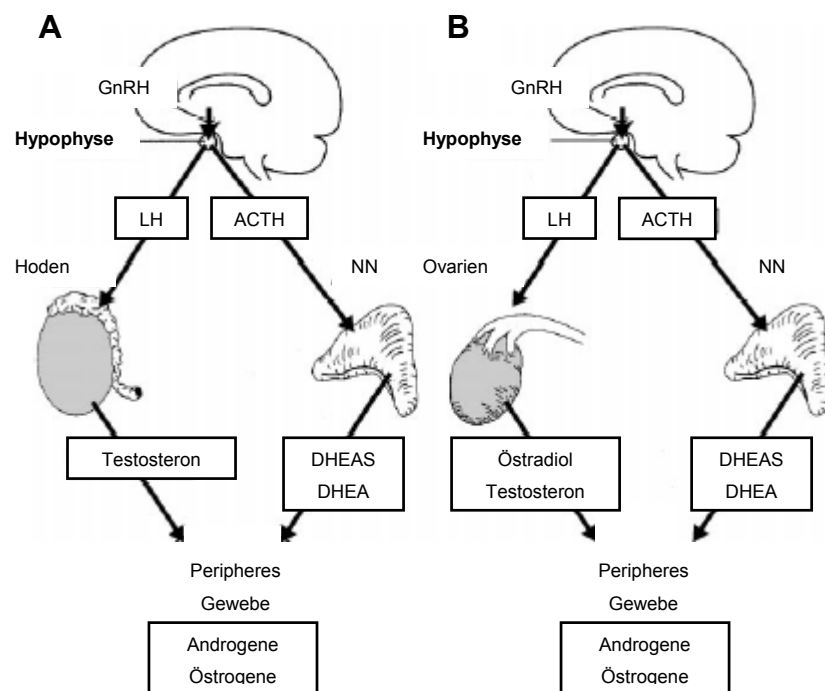


Abb. 3: Schematische Darstellung der Produktion gonadaler und adrenaler Geschlechtshormone bei Männern (A) und prämenopausalen Frauen (B). Eigene Darstellung nach Labrie et al., 2001. Abkürzungen: ACTH, Adrenokortikotropin; DHEA, Dehydroepiandrosteron; DHEAS, DHEA-Sulfat; LH, Luteinisierendes Hormon; GnRH (=LHRH), *Gonadotropin-Releasing-Hormone*; NN, Nebenniere.

Bei Männern werden 95% des aktiven Testosterons in den Leydigzellen der Hoden synthetisiert, ins Blut abgegeben und gelangen somit zu den peripheren Geweben. Daneben synthetisieren die Leydigzellen geringe Mengen an Dihydrotestosteron, DHEA, Androstendion, 17β -Östradiol, Östron, Pregnenolon, Progesteron, 17α -Hydroxypregnenolon und 17α -Hydroxyprogesteron (Braunstein, 2004). Im Gegensatz zu den adrenalen Hormonen gibt es bei gesunden Männern kaum Veränderungen in den Serumkonzentrationen der gonadal gebildeten Hormone. Während das Testosteron im Alter von 40 bis 80 Jahren stetig leicht absinkt, bleiben die Dihydrotestosteronspiegel – vermutlich durch eine erhöhte 5α -Reduktaseaktivität im peripheren Gewebe – unverändert (Bélanger et al., 1994). Die Serumspiegel an 17β -Östradiol bleiben bei Männern bei der gleichen Studie unverändert; die des Östrons hingegen sinken im Laufe des Alters stetig ab (Bélanger et al., 1994).

Bei prämenopausalen Frauen wird in den Ovarien neben einer kleinen Menge an Testosteron hauptsächlich 17β -Östradiol hergestellt. 95% des zirkulierenden 17β -Östradiols sind ovariellen Ursprungs. Während die Thekazellen unter dem Einfluss von LH Androgene produzieren, werden in den Granulosazellen durch die Stimulation von FSH und LH über die Expression der Aromatase die Östrogene synthetisiert (Rosen und Cedars, 2004). Nach der Menopause stellen jedoch die adrenalen Vorläuferhormone DHEAS und DHEA bei der Frau die einzige Quelle für Sexualhormone dar, aus denen in den Zielzellen Androgene und Östrogene gebildet werden können (Labrie et al., 2001). Die Steroidhormonbiosynthese läuft in den Gonaden und peripheren Geweben bis zum DHEA und Androstendion wie in der Nebennierenrinde ab (s. o.). Diese beiden Hormone können nun in den Gonaden und in peripheren Geweben durch die 17β -Hydroxylase in Androstendiol und Testosteron umgewandelt werden. Mit Hilfe der 5α -Reduktase wird das Testosteron zum Dihydrotestosteron – dem Steroid mit der stärksten androgenen Wirkung – reduziert. Androstendion und Testosteron sind die Substrate der Aromatase und werden von diesem Enzym in die Östrogene Östron und 17β -Östradiol umgewandelt. Eine Übersicht über die Steroidhormonproduktion in den Gonaden und peripheren Geweben zeigt Abbildung 4.

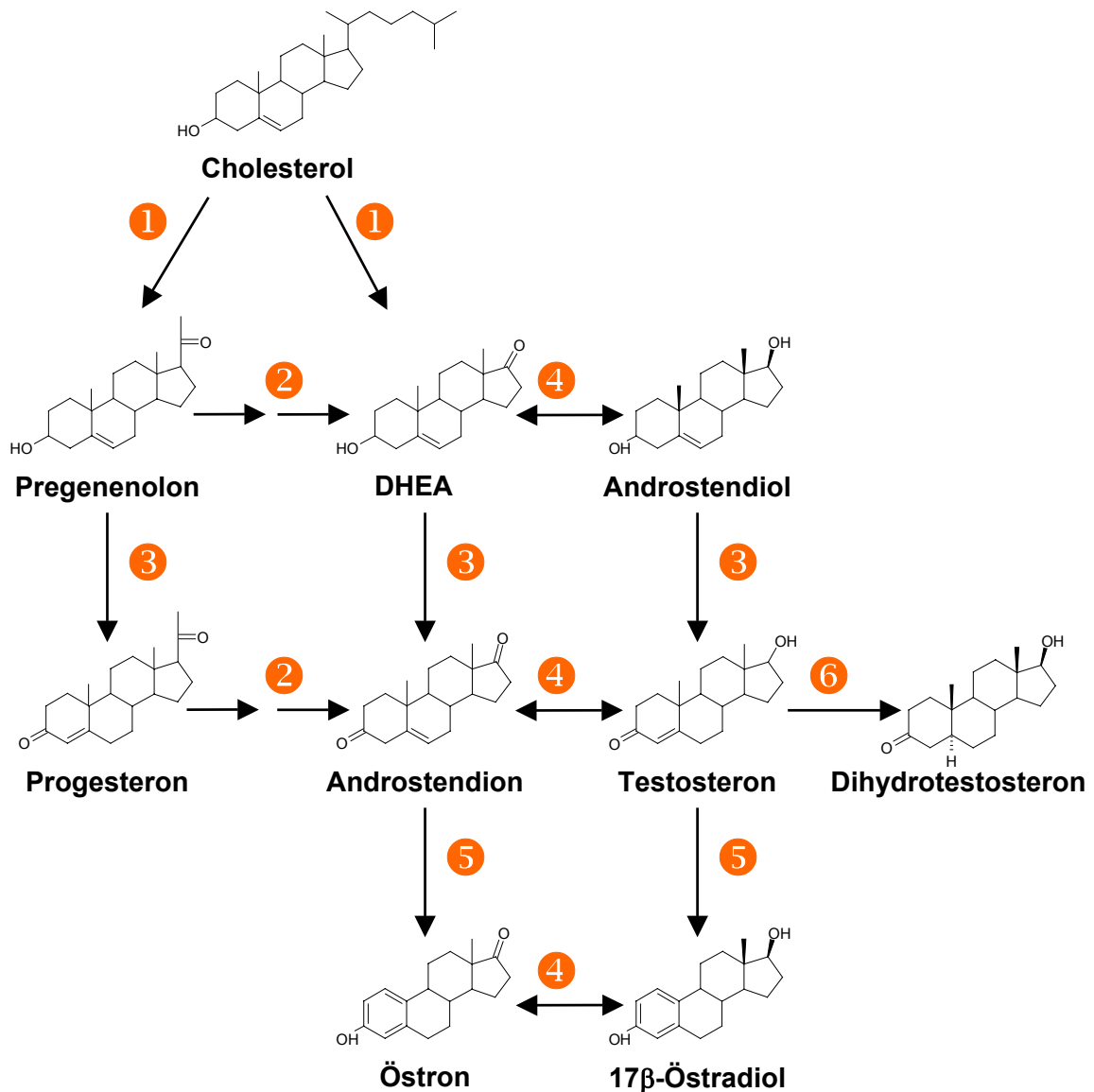


Abb. 4: Steroidhormonsynthese in den Gonaden und peripheren Geweben. ❶ Cholesterol-20,22-desmolase; ❷ 17 α -Hydroxylase, 17,20-Lyase; ❸ 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase; ❹ 17 β -Hydroxylase; ❺ Aromatase; ❻ 5 α -Reduktase.

1.3.4 Zirkulation und Metabolismus der Steroidhormone

Die Steroidhormone zirkulieren im Blut nur zu einem geringen Anteil. Hauptsächlich sind sie an Steroid bindende Proteine gebunden. Dabei gibt es unspezifische und spezifische Bindungsproteine. 75% des Kortisols im Blut ist an das Kortikosteroid-bindende-Globulin (CBG) gebunden und weitere 10% liegen gebunden an Albumin vor. Die restlichen 15% des Kortisols zirkulieren

frei im Plasma. Synthetische Glukokortikoide – mit Ausnahme von Prednisolon, welches an CBG bindet – liegen vor allem an Albumin gebunden vor.

Die adrenalen Androgene DHEAS, DHEA und Androstendion sowie 17β -Östradiol zirkulieren meist frei im Blut. Testosteron liegt nur zu etwa 2% frei im Serum vor. Der Hauptanteil ist an Albumin (38%) und an das Sex Hormon bindende Globulin (60%) gebunden (Aron et al., 2004; Braunstein, 2004). Die folgende Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die Gesamtkonzentrationen der wichtigsten zirkulierenden Steroidhormone im Blut. Es ist zu erkennen, dass die Serumkonzentration des adrenal gebildeten Vorläuferhormons DHEAS im Vergleich zu den aktiven Steroidhormonen, Testosteron und 17β -Östradiol, beim gesunden Erwachsenen etwa 100-500fach bzw. 1000-10000fach höher liegt. DHEAS und DHEA stellen ein Reservoir für die lokal in den jeweiligen Zielgeweben gebildeten Androgene und Östrogene dar. Beide Vorläuferhormone werden von den Zielzellen aufgenommen und können dort zu aktiven Steroidhormonen konvertiert werden. Eine Gabe von DHEA bewirkt bei gesunden Personen keine Veränderung der aktiven Steroidhormonkonzentrationen im Serum, sondern hauptsächlich eine Erhöhung der glukuronierten und sulfatierten Metabolite (Labrie et al., 1997). Diese Beobachtung bestätigt den Begriff der Intrakrinologie, der erstmals von Labrie et al. 1988 formuliert wurde (Labrie et al., 1988). Er besagt, dass die Synthese aktiver Steroidhormone – ausgehend von DHEAS und DHEA – in den Zellen stattfindet, in denen sie ihre Wirkung ausüben. Dabei treten die aktiven Metabolite nicht in den Kreislauf über (Labrie et al., 2001).

Tab. 2: Gesamtsteroidhormonkonzentrationen im Serum von Männern im Alter von 30-50 bzw. 60-80 Jahren sowie von Frauen vor und nach der Menopause (nach Greenspan und Gardner, 2004).

Hormon	Männer		Frauen	
	30-50	60-80	prämeno- pausal	postmeno- pausal
Kortisol [nmol/l]	83-552			
DHEAS [μmol/l]	1.6-12.3	0.3-7.8	0.3-12.3	0.1-2.1
DHEA [nmol/l]	5.6-27.8		5.6-27.8	1.0-15.6
Testosteron [nmol/l]	9.0-34.7		0.5-2.4	0.17-1.8
17β-Östradiol [pmol/l]	37-184		367-1285	37-110

Während bei Männern die Steroidhormonkonzentrationen im Blut – DHEAS ausgenommen – das Leben über relativ konstant bleiben, fällt bei Frauen nach der Menopause vor allem die Konzentration des 17β-Östradiols im Serum stark ab. Die Vorläuferhormone DHEA und DHEAS stellen dann einen wichtigen Pool für die Bildung aktiver Androgene und Östrogene in der Peripherie dar. Allerdings sinkt im Alter die Konzentration an DHEAS bei beiden Geschlechtern deutlich (Rosen und Cedars, 2004).

Die Inaktivierung der Steroidhormone geschieht in der Leber durch Reduzierung, Glukuronidierung und Sulfatierung. 90% dieser so metabolisierten Steroide werden im Urin ausgeschieden. Eine Besonderheit stellt hierbei das Kortisol dar. Es kann in einigen Geweben selbst zu Kortison inaktiviert und wieder zu Kortisol reaktiviert werden. Dies ist möglich durch die oxidierenden und reduzierenden Eigenschaften der beiden Isoenzyme 11β-Hydroxysteroiddehydrogenase (11β-HSD) 1 und 2 (siehe Abbildung 5 S. 15). Während die Isoform des Typs 1 beide Aktivitäten besitzt, kann die 11β-HSD 2 nur in Richtung des inaktiven Kortisons oxidierend wirken (Aron et al., 2004).

1.4 Biologische Effekte der Steroidhormone und deren Veränderungen bei der rheumatoiden Arthritis

1.4.1 Kortisol

Bei Patienten mit RA ist die Konzentration an Kortisol im Blut normal (Cutolo et al., 1988; Cutolo et al., 1999; Kanik et al., 2000) oder leicht erhöht (Straub et al., 2002c). Wenn man aber das Entzündungsmaß bei Patienten mit RA in Betracht zieht, sind die Serumspiegel an Kortisol in Relation zu den Konzentrationen an IL-6 und TNF im Serum erniedrigt (Straub et al., 2002c). Diese unzureichende Kortisolkonzentration ist nicht auf eine vermehrte Eliminierung oder Ausscheidung des Kortisols oder Kortisons im Urin zurückzuführen (Crofford et al., 1997; Rovensky et al., 2003; Straub et al., 2004). Auch ein Defekt in der Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse scheint nicht vorzuliegen, da in den meisten Studien die RA-Patienten auf Stimulationstests durch CRH (Crofford et al., 1997; Cutolo et al., 1999; Harbuz et al., 2003; Mastorakos und Ilias, 2000) oder Stressoren wie zum Beispiel Hypoglykämie oder eine Operation (Chikanza et al., 1992; Dekkers et al., 2001; Eijabouts, 1998; Gutiérrez et al., 1999; Hirano et al., 2001; Straub et al., 2002a) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer ähnlichen oder leicht veränderten Kortisolantwort reagieren. Das Problem der unzureichenden Kortisolsekretion liegt wahrscheinlich eher auf der Ebene der Nebenniere, die als Antwort auf die Entzündung keine ausreichende Menge an Kortisol sezerniert (Harbuz und Jessop, 1999; Straub und Cutolo, 2001). Die Hemmung der Kortisolproduktion in adrenalen Zellen durch TNF bestätigt diese Vermutung (Jäätelä et al., 1991).

Ein weiterer Gesichtspunkt ist der Zusammenhang zwischen den Kortisol- und Zytokinkonzentrationen im Tagesverlauf. Wie die Kortisolspiegel folgen auch die Zytokine und demzufolge die Krankheitsaktivität einem zirkadianen Rhythmus. Dabei gehen die klinischen Symptome in den frühen Morgenstunden mit den höchsten Konzentrationen an IL-6 und TNF im Blut einher. Allerdings ist der Kortisolspiegel zu diesem Zeitpunkt relativ niedrig und erreicht erst später sein Maximum. Die unzureichende Kortisolausschüttung

könnte zu den morgendlichen Symptomen der RA führen (Cutolo et al., 2003; Petrovsky et al., 1998; Zoli et al., 2002).

Die lokale Verfügbarkeit des Kortisols (und auch von synthetischen Glukokortikoiden) ist abhängig von dem Kortisol-konvertierenden-Enzym 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (11 β HSD) im Gewebe. Die bidirektionale Reaktion von Kortisol zu Kortison und umgekehrt wird durch zwei Isoenzyme katalysiert. Während die 11 β HSD 1 sowohl oxidierende als auch reduzierende Eigenschaften besitzt, kann die Isoform 2 nur in Richtung des inaktiven Kortisons reduzierend wirken. Die folgende Abbildung 5 verdeutlicht die Aktivitäten der beiden Isoenzyme.

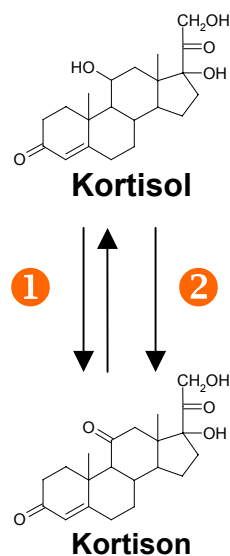


Abb. 5: Die bidirektionale Reaktion der 11 β HSD. ❶ 11 β HSD 1; ❷ 11 β HSD 2.

Während die Isoform 2 in der Niere, Nebenniere und in der Plazenta exprimiert ist und dort für die Inaktivierung des Kortisols zuständig ist, findet man die Isoform 1 in vielen peripheren Geweben wie Leber, Lunge, Gehirn, Fettgewebe und Haut. Die 11 β HSD 1 reguliert in diesen Geweben lokal die Kortisolverfügbarkeit (Edwards et al., 1996; Hennebold und Daynes, 1998; Mazzocchi et al., 1998; Seckl und Walker, 2001). Neben verschiedenen Geweben konnte auch in Leukozyten der Maus und humanen Makrophagen die Expression der 11 β HSD 1 nachgewiesen werden (Hennebold et al., 1996; Thieringer et al., 2001).

Durch die Stimulierung der bidirektionalen Reaktion der 11 β HSD 1 in Richtung des aktiven Kortisols durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und

TNF oder Stress kommt es zu einer erhöhten lokalen Kortisolproduktion (Cai et al., 2001; Escher et al., 1997; Quinkler et al., 2003; Tomlinson et al., 2001). Durch die bekannten immunsuppressiven Effekte des Kortisols wäre eine derartige Situation bei einer chronisch entzündlichen Erkrankung wie der RA von Vorteil. Die Therapie mit Glukokortikoiden wird seit langem mit Erfolg bei der RA eingesetzt. So werden zum Beispiel durch eine Dexamethason-Puls-Therapie Entzündungsparameter im Blut wie IL-6, IL-8, die Blutsenkungsrate oder das C-reaktive Protein gesenkt, was zu einer Verminderung der Krankheitsaktivität führt (van den Brink et al., 1994). Neben der Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine weist Kortisol weitere positive Eigenschaften auf. So verringert es die Immunglobulinproduktion und induziert Apoptose (Ashwell et al., 2000). Eine Kortisolgabe an Patienten mit RA führt weiterhin zu einer geringeren Anzahl von Monozyten und Lymphozyten im Blut und vermindert die Anzahl an Adhäsions- und Phagozytorezeptoren an der Oberfläche von Monozyten (Steer et al., 1998; Torsteinsdóttir et al., 1999). Wegen dieser positiven Effekte des Kortisols ist nun die lokale Verfügbarkeit dieses Steroidhormons von Interesse. Bei der experimentellen Dermatitis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde bereits gezeigt, dass das Enzymsystem der 11 β HSD lokal bei chronischen Erkrankungen eine Rolle spielt (Hennebold und Daynes, 1998; Takahashi et al., 1999). Wie sich jedoch die Konversion von Kortisol zu Kortison und umgekehrt in primären Synoviozyten bei Patienten mit RA und OA verhält, ist unbekannt.

1.4.2 DHEAS und DHEA

Bei Patienten mit RA sind erniedrigte DHEAS-Spiegel im Serum sowohl bei Männern als auch bei Frauen gefunden worden (Deighton et al., 1992; Dessein et al., 2001; Sambrook et al., 1988). Diese Erniedrigung des adrenalen Steroids DHEAS scheint eine Folge der Erkrankung zu sein, da verminderte DHEAS-Spiegel weder ein Risikofaktor für die Entstehung einer RA sind (Heikkilä et al., 1998) noch in der frühen Phase der Erkrankung (< 15 Monate) auftreten (Giltay et al., 1998; Josipovic und Josipovic, 2002; Kanik et al., 2000). Allein in der Gruppe der prämenopausalen Frauen, die vor dem 50. Lebensjahr an RA erkrankten, konnten erniedrigte Serumspiegel an DHEAS

bereits vor dem Beginn der Erkrankung nachgewiesen werden (Masi et al., 2000). Dieses Phänomen der verminderten DHEAS-Spiegel tritt nicht nur bei Patienten mit RA auf, sondern ist auch bei anderen chronischen Erkrankungen wie bei SLE (Lahita et al., 1987), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Straub et al., 1998b), systemischer Sklerose (Straub et al., 1997) und dem Sjögren Syndrom (Sullivan et al., 2003; Valtysdóttir et al., 2001) zu beobachten.

Die Serumkonzentrationen an DHEA hingegen sind bei der RA im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nicht unbedingt erniedrigt. Während in der frühen Phase der Erkrankung die DHEA-Konzentrationen im Serum unverändert (Kanik et al., 2000) oder erhöht (Straub et al., 2002b) sind, ist im späteren Verlauf der RA eine Verminderung der DHEA-Spiegel zu beobachten (Cutolo et al., 1999; Vogl et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse zeigt auch eine Studie an Mäusen. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren, die eine Verminderung der DHEA-Konzentrationen aufweisen, bleiben bei Mäusen mit einer Kollagen-induzierten Arthritis die DHEA-Spiegel unverändert (Kobayashi et al., 2003).

Sowohl DHEAS als auch DHEA sind negativ mit bestimmten Krankheitsparametern wie dem C-reaktiven Protein oder verschiedenen Aktivitätsindizes der RA assoziiert (Deighton et al., 1992; Josipovic und Josipovic, 2002; Kanik et al., 2000). Einen großen Einfluss auf die Konzentration des DHEAS im Serum hat die Einnahme von Glukokortikoiden. Diejenigen Patienten unter Kortisolmedikation haben deutlich erniedrigte DHEAS-Spiegel im Vergleich zu RA-Patienten ohne Einnahme von Steroiden (Dessein et al., 2001; Hall et al., 1993; Montecucco et al., 1992; Sambrook et al., 1988; Vogl et al., 2003). Die Serumkonzentrationen von Androstendion – dem Dritten von der Nebennierenrinde produzierten Androgen – sind sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Patienten mit RA ebenfalls erniedrigt (Mateo et al., 1995; Montecucco, 1992).

Die verminderte Sekretion adrenaler Steroidhormone in der chronischen Phase der RA macht insgesamt deutlich, dass hier in Bezug auf das Entzündungsausmaß eine inadäquate Bildung der Steroidhormone in der Nebennierenrinde vorliegt, da DHEAS und DHEA nicht vermehrt im Urin ausgeschieden werden (Straub et al., 2003). Daneben ist auch eine Dissoziation der

Sekretion der verschiedenen adrenalen Steroidhormone zu beobachten. Während bei gesunden Kontrollpersonen die Konzentrationen an DHEA und Kortisol positiv korrelieren, ist diese Beziehung bei Patienten mit RA aufgehoben (Kanik et al., 2000). Masi et al. (Masi et al., 2000) berichten, dass in der Gruppe der prämenopausalen Frauen schon vor der Erkrankung eine negative Korrelation zwischen DHEAS und Kortisol besteht, und diese Autoren führen dies auf eine adrenale Dysfunktion zurück. Da das Vorläuferhormon Pregnenolon unverändert produziert wird (Vogl et al., 2003), liegt bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen vermutlich eine Verschiebung der Produktion adrenaler Steroide auf der Ebene anderer Enzyme vor. So werden auf Kosten von DHEAS und Androstendion Kortisol und DHEA vermehrt produziert (Straub et al., 2000a; Straub et al., 2002b).

In den Zielgeweben wird das im Blut zirkulierende DHEAS in die Zellen aufgenommen und in aktive Steroidhormone umgewandelt. Der erste Schritt hierbei ist die Desulfatierung des DHEAS durch die mikrosomale DHEAS-Steroidsulfatase (STS) in das aktive Androgen DHEA (Labrie et al., 2001). Dieses Enzym ist bereits in vielen peripheren Geweben wie z. B. im Gehirn oder der Plazenta nachgewiesen worden (Hernandez-Guzman et al., 2001; Steckelbroeck et al., 2004). Unter inflammatorischen Bedingungen zeigt sich eine Veränderung der Expression und/oder der Enzymaktivität der STS. So wird zum Beispiel unter dem Einfluss von IL-1 β die Expression und Aktivität der STS vermindert (Masuoka et al., 2002; Nakamura et al., 2003). Auch IL-6 und LPS wird in Verbindung mit der Modulation steroidkonvertierender Enzyme gebracht (Schmidt et al., 2000; Speirs et al., 1999; Young et al., 1999). In murinen Makrophagen konnte die Inhibierung der Konversion von DHEAS zu DHEA durch TNF gezeigt werden (Hennebold und Daynes, 1994).

Neben der androgenen Wirkung von DHEA (Labrie et al., 1988) sind auch antiinflammatorische Wirkungen von DHEAS und DHEA in mehreren Studien gezeigt worden. So hemmt DHEA die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF (Kimura et al., 1998; Padgett und Loria, 1998; Straub et al., 1998a). Außerdem vermindern DHEAS und DHEA die Apoptose in peripheren Blutlymphozyten (Takahashi et al., 2004). DHEA weist weiterhin antioxidative Eigenschaften auf. So fungiert es als Hydroxylradikalfänger und hemmt die Zytokin-induzierte Transkription von NF κ B (Iwasaki et al., 2004;

Tamagno et al., 1998). Auch weisen DHEAS und DHEA positive Effekte auf den Knochen auf. Die Serumkonzentration an DHEAS bei postmenopausalen RA-Patienten korreliert mit der Knochendichte (Sambrook et al., 1992). Positive Ergebnisse zeigte ferner eine DHEA-Supplementationsstudie bei Patienten mit SLE. Die durch Glukokortikoidtherapie verminderte Knochendichte konnte durch Gabe von DHEA signifikant verbessert werden (van Vollenhoven et al., 1999). Wegen der bekannten Einflüsse von Zytokinen auf die STS und auf Grund der oben aufgeführten positiven Wirkungen von DHEA ist die Untersuchung der Enzymaktivität der STS in einem entzündlichen Gewebe wie dem Synovium bei Patienten mit RA von Interesse.

1.4.3 Gonadale und peripher gebildete Geschlechtshormone

Die Tatsache, dass von der RA hauptsächlich Frauen betroffen sind, führte zu vielen Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen hormonalen Einflüssen und dem Risiko an RA zu erkranken. Sowohl Kinderlosigkeit (Spector et al., 1990) als auch eine direkt vorhergehende Schwangerschaft (Jorgensen et al., 1996) sind mit einem erhöhten Risiko verbunden, an RA zu erkranken. Während eine Schwangerschaft oft mit einer geringeren Krankheitsaktivität einhergeht (Lee Nelson et al., 1993), erhöht sich vor allem in den ersten drei Monaten nach der Geburt das Risiko, an RA zu erkranken. Auch das Stillen mit hohen Prolaktin- und Oxytocinspiegeln wird in Zusammenhang mit dem Auftreten der RA gebracht (Brennan und Silman, 1994; Silman et al., 1992). Die Einnahme oraler Kontrazeptiva oder von Hormonerersatzpräparaten zeigt widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit, an RA zu erkranken (Silman und Pearson, 2002). Möglicherweise ist der protektive Einfluss oraler Kontrazeptiva auf die höhere Dosierung von Östrogenen und Progestinen in früheren Jahren dieser Therapie zurückzuführen und ist deshalb in neueren Studien nicht mehr nachzuweisen (Doran et al., 2004).

Bei männlichen RA-Patienten sind die Konzentrationen an 17β -Östradiol und Dihydrotestosteron im Blut unverändert (Cutolo et al., 1988). Festzuhalten ist jedoch, dass die Testosteronspiegel bei Männern mit RA erniedrigt sind, was vermutlich auf eine unzureichende gonadale Produktion der Androgene zurückzuführen ist (Cutolo et al., 1988; Gordon et al., 1988; Kanik et al., 2000;

Mateo et al., 1995; Tengstrand et al., 2002). Bei weiblichen Patienten mit RA hingegen stellt sich die Datenlage nicht so eindeutig dar. Man findet im Serum bei Frauen mit RA sehr unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Konzentrationen an aktiven Androgenen und Östrogenen. Die Spiegel des potentesten Östrogens 17 β -Östradiol sind in einigen Studien im Vergleich zu gesunden Kontrollen unverändert (Cutolo et al., 1999; Deighton et al., 1992; Sambrook et al., 1988) oder erhöht (Montecucco et al., 1992). Östron hingegen ist unter Prednisolontherapie vermindert (Sambrook et al., 1988). Die Testosteronkonzentration im Serum unterscheidet sich bei Frauen nicht (Cutolo et al., 1999; Deighton et al., 1992). Bei Einnahme von Kortisolpräparaten hingegen sind die Testosteronspiegel vermindert (Sambrook et al., 1988). Steroidhormonanalysen von Synovialflüssigkeiten von Patienten mit RA im Vergleich zu Patienten mit akutem Trauma zeigen, dass RA-Patienten erhöhte Konzentrationen an Östrogenen in Relation zu Androgenen aufweisen (Castagnetta et al., 2003).

An dieser Stelle sollen kurz die pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften der Androgene und Östrogene dargestellt werden. Androgene haben insgesamt einen hemmenden Einfluss auf die Immunantwort. Es ist gezeigt worden, dass Testosteron die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β oder TNF inhibiert (Cutolo et al., 1993; Keller et al., 1996). Außerdem senkt es die Produktion von Immunglobulinen in peripheren Blutmonozyten in gesunden und an SLE erkrankten Personen (Kanda et al., 1994; Kanda et al., 1997). Weiterhin verstärkt Methyltestosteron in Anwesenheit von Glukokortikoiden die Apoptose in CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen (Dulos und Bagchus, 2001). Die Wirkung der Östrogene hingegen scheint konzentrationsabhängig zu sein. In niedrigen Dosierungen stimulieren sie die Immunantwort. So findet in humanen Monozyten eine gesteigerte IL-1 β - und Immunglobulinproduktion durch 17 β -Östradiol statt (Kanda et al., 1999; Polan et al., 1990). Auch humane Synoviozyten steigern die Sekretion von Metalloproteinasen durch niedrige Konzentrationen von Östrogen (Khalkhali-Ellis et al., 2000). Im Gegensatz dazu bewirken hohe Dosierungen von Östrogenen eher einen immunsuppressiven Effekt. 17 β -Östradiol zeigt in peripheren Monozyten eine vermindernde Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF (Evans et al., 1997; Polan et al., 1989). In einer Supplementationsstudie an

RA-Patienten mit Ethinylöstradiol verbesserten sich mehrere Krankheitsparameter wie Blutsenkungsrate, C-reaktives Protein und die Anzahl an geschwollenen Gelenken (Bijlsma et al., 1987). Eine Studie an CD4⁺ T-Zellen verdeutlicht den biphasischen Effekt der Östrogene. Während bei niedrigen Konzentrationen die Östrogene Östron, 17 β -Östradiol und Östriol die TNF-Sekretion in diesen Zellen stimulierten, inhibierten sie dessen Produktion bei höheren Konzentrationen (Correale et al., 1998).

17 β -Östradiol und Östron können weiterhin an unterschiedlichen C-Atomen hydroxyliert werden. Verschieden hydroxylierte Östrogene, darunter z. B. 16 α -Hydroxyöstron, sind bei RA und SLE im Serum oder der Synovialflüssigkeit vermehrt gemessen worden (Bucala et al., 1985; Castagnetta et al., 2003). Aus 17 β -Östradiol und Östron können neben den 16-hydroxylierten Formen auch 2-hydroxylierte Östrogene gebildet werden. Untersuchungen mit den verschiedenen hydroxylierten Metaboliten zeigen gegensätzliche Effekte. Während das 2-hydroxylierte Östron allgemein als „gutes“ Östrogen bezeichnet wird, ist das 16 α -Hydroxyöstron ein mitogenes Östrogen. Letzteres kann kovalent an den Östrogenrezeptor binden und übt somit möglicherweise seine trophischen Eigenschaften aus (Fishman und Martucci, 1980; Swanek und Fishman, 1988). In humanen Brustkrebszellen konnten die proliferativen Eigenschaften der 16 α -hydroxylierten Östrogene gezeigt werden. Die 2-hydroxylierten Östrogene hingegen hatten einen deutlich antiproliferativen Effekt auf die Brustkrebszellen (Schneider et al., 1984). In prospektiven Studien konnte ein höheres Verhältnis der 2 α - zu den 16 α -hydroxylierten Östrogenen mit einem verminderten Brustkrebsrisiko assoziiert werden (Meilahn et al., 1998; Muti et al., 2000). Zusammenfassend haben die 16 α -hydroxylierten Östrogene eine starke östrogene Wirkung, während die 2-hydroxylierten eine schwache Aktivität aufweisen. Die Rolle der beiden unterschiedlich hydroxylierten Metabolite soll bei Patienten mit RA und SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen untersucht werden.

1.4.4 Steroidhormonrezeptoren

Das Prinzip der Wirkungsweise der Steroidhormone ist bei allen Hormonen ähnlich. Die Steroidhormone gelangen über das Blut zu ihren Zielorganen,

wo sie wegen ihres lipophilen Charakters durch die Zellmembran in die Zelle gelangen. Im Zytoplasma binden sie an ein zytoplasmatisches Rezeptorprotein der *Steroid-Thyroid-Hormone-Nuclear-Superfamily*, die mit Hitzeschockproteinen assoziiert sind. Nach der Bindung der Hormone dissoziieren diese Proteine und durch die damit verbundene Konformationsänderung des Rezeptors kann dieser in den Zellkern translozieren. Der Steroidhormon-Rezeptor-Komplex bindet nun mit seiner DNA-bindenden Domäne an ein Chromatinprotein der DNA oder interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren wie NF κ B. Dadurch kommt es zu einer veränderten Genexpression und zur Synthese spezifischer mRNAs. Diese Effekte können – je nach betroffenem Gen und Gewebeart – inhibitorisch oder stimulatorisch sein. Zytoplasmatische Rezeptoren gibt es für verschiedene Steroidhormone und sie können auch in den gleichen Zellen exprimiert werden (Aranda und Pascual, 2001; McKay und Cidlowski, 1999). Rezeptoren für verschiedene Steroidhormone wurden in humanem Synovialgewebe von Patienten mit RA sowie von gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen, so dass man davon ausgehen kann, dass die Steroidhormone dort auch ihre Wirkung ausüben können (Cutolo et al., 1996; Ishizuka et al., 2004). Die Rezeptoren für Östrogene und Androgene wurden hauptsächlich in Entzündungszellen wie Makrophagen gefunden, aber auch Fibroblasten exprimieren Steroidhormonrezeptoren. Die Dichte an Rezeptoren ist im Synovialgewebe unterschiedlich. Die höchste Dichte findet man in der synovialen Deckzellschicht (Ishizuka et al., 2004), wobei der Anteil der Steroidhormonrezeptor-positiven Makrophagen hier bei Patienten mit RA höher ist als bei Kontrollpersonen mit Knie-traumata (Cutolo et al., 1992; Cutolo et al., 1996). Beide Studien zeigen eine verminderte Expression der Androgenrezeptoren auf mRNA- und Proteinebene im Vergleich zu Östrogenrezeptoren (Cutolo et al., 1996; Ishizuka et al., 2004). Glukokortikoidrezeptoren sind sowohl im Blut (Bartholome et al., 2004; Eggert et al., 2002; Schlaghecke et al., 1994) als auch im Synovialgewebe (DiBattista et al., 1999; Pelletier et al., 1999) und Knorpel (DiBattista et al., 1991; DiBattista et al., 1993) nachgewiesen worden. Unter dem Einfluss von Glukokortikoiden und nicht steroidal antiinflammatorischen Medikamenten wird sowohl in Lymphozyten als auch in synovialen Fibroblasten die Expression der Rezeptoren vermindert (Eggert et al., 2002; Pelletier et al., 1999).

1.5 Neuronale Veränderungen bei der rheumatoiden Arthritis

Neben der Bedeutung der hormonalen Aspekte spielen auch neuronale Faktoren im Krankheitsverlauf der RA eine Rolle. Dafür spricht die Beobachtung, dass sich rheumatische Erkrankungen bei Patienten mit Hemiparalyse nicht auf die gelähmte Seite ausbreiten (Dolan, 1995; Lapadula et al., 1997). Auch der symmetrische Befall der Gelenke ist ein typisches Phänomen der RA und im Tiermodell der Arthritis (Al-Matar et al., 2002; Kidd et al., 1995). Zum Beispiel breitet sich die bei Ratten einseitig induzierte Monoarthritis auch auf die kontralaterale Extremität aus. Bei Durchtrennung der Nerven auf der nicht befallenen Seite ist dies nicht mehr zu beobachten (Kidd et al., 1995). Sowohl sensible als auch sympathische Nervenfasern sind im Synovialgewebe von Patienten mit RA in mehreren Studien nachgewiesen worden (Miller et al., 2000; Niissalo et al., 2002; Pereira da Silva und Carmo-Fonseca, 1990). Auch die jeweiligen Neuropeptide sind in Synovialflüssigkeiten von RA-Patienten gemessen worden (Alstergren et al., 1995). Da sich jedoch die Wirkungen der Nervensysteme mit ihren Neurotransmittern deutlich voneinander unterscheiden, werden sie im Folgenden getrennt betrachtet.

1.5.1 Das sensible Nervensystem

Das sensible Nervensystem spielt bei Wundheilungsprozessen eine bedeutende Rolle. So wurde nach experimenteller Ruptur der Achillessehne der Ratte das Einwachsen Substanz P-positiver Nervenfasern beobachtet. Dies ging mit gesteigertem Schmerzempfinden einher. Nach dem Abheilen der Wunde waren praktisch keine sensiblen Nervenfasern mehr nachzuweisen (Ackermann et al., 2003). Im chronischen Stadium der RA ist im Synovium eine höhere Dichte an Substanz P⁺ (SP; ein sensibler Neurotransmitter) Nervenfasern im Vergleich zu OA festgestellt worden (Miller et al., 2000; Miller et al., 2002). Auch im Tiermodell der Arthritis sind erhöhte Konzentrationen an SP im Gelenk gefunden worden (Ahmed et al., 1995). Dies erklärt mögli-

cherweise die auftretenden Schmerzen bei der Erkrankung. Diese Erscheinung der erhöhten sensiblen Nervenfaserdichte tritt auch bei einer weiteren chronischen Erkrankung – einer Variante des Asthmas – auf (Lee et al., 2003).

Der Einfluss des sensiblen Neurotransmitters SP auf das Immunsystem und den Krankheitsverlauf soll nun mit seinen Eigenschaften dargestellt werden. Tierversuche an arthritischen Ratten verdeutlichen den proinflammatorischen Einfluss von SP auf den Krankheitsverlauf. Die Injektion von SP in das Entzündungsgebiet verschlechtert die Arthritis in diesem Gelenk (Levine et al., 1985). In einer anderen Studie führt die SP-Gabe in gesunden und entzündeten Rattengelenken zu einer erhöhten Sensibilisierung mit einer erhöhten Schmerzempfindlichkeit (Heppelmann und Pawlak, 1997). Die Blockade des SP-Signalweges durch einen SP-Antagonisten bewirkt hingegen eine fast komplette Hemmung einer induzierten Entzündung im Karrageenan-Rattenmodell (Lam und Ferrell, 1989). SP stimuliert weiterhin die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine aus Immunzellen. So induziert sie die Produktion von IL-1, IL-2 und IL-8 aus murinen Lymphozyten (Rameshwar et al., 1993) bzw. humanen Leukozyten (Serra et al., 1994). Auch die TNF-Expression in Mastzellen wird durch die SP gesteigert (Ansel et al., 1993). Eine weitere Wirkung der SP ist die Stimulierung der Fibroblastenproliferation, wobei dieser Effekt zum Teil synergistisch mit IL-1 vermittelt wird (Katayama und Nishooka, 1997; Rameshwar et al., 1997). Zuletzt sei noch die Aktivierung von humanen Neutrophilen bzw. Leukozyten durch SP genannt, die mit einem erhöhten O_2 -Verbrauch und einer vermehrten H_2O_2 - bzw. O_2^- -Produktion einhergeht (Serra et al., 1988; Serra et al., 1994).

1.5.2 Das sympathische Nervensystem

Bei Patienten mit chronischer RA ist im Synovialgewebe ein drastischer Verlust an sympathischen Nervenfasern im Vergleich zu Kontrollpersonen festgestellt worden (Miller et al., 2000; Miller et al., 2002; Pereira da Silva und Carmo-Fonseca, 1990). Für die Charakterisierung der sympathischen Nervenfasern wurde hierbei das Schlüsselenzym der Noradrenalinproduktion, die Tyrosinhydroxylase (TH), verwendet. Die Dichte an TH-positiven Nervenfasern korrelierte dabei negativ mit dem Entzündungsstatus im Synovium

und der IL-6-Sekretion aus dem Gewebe (Miller et al. 2000). Jedoch ist die Freisetzung des sympathischen Neurotransmitters Noradrenalin aus dem Synovialgewebe im Vergleich zu OA-Patienten nicht vermindert. Seine Herkunft sind vermutlich synoviale Makrophagen oder andere TH⁺ Zellen (Miller et al., 2000; Miller et al., 2002). Die Entfernung des Sympathikus im Tierrmodell verdeutlicht seinen zeitabhängigen unterschiedlichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Während eine Sympathektomie vor der Erkrankung einen deutlich milderen Verlauf der induzierten Arthritis zur Folge hat (Härle et al., zur Publikation angenommen; Sluka et al., 1994), führt eine Spätsympathektomie zu einer Verschlechterung der klinischen Parameter bei den Tieren (Härle et al., zur Publikation angenommen; Levine et al., 1985). Das sympathische Nervensystem zeigt somit eine duale Rolle mit einem proinflammatorischen Einfluss in der frühen Phase der Entzündung und einen antiinflammatorischen Einfluss im späteren Verlauf der Erkrankung (Levine et al., 1988; Lorton et al., 1999). Die Ursache dieser Beobachtung liegt in der unterschiedlichen Zytokinstimulierung in den lymphatischen Organen. So konnte gezeigt werden, dass die Frühsympathektomie im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren zu erhöhten IL-10- und IL-4-Konzentrationen in den lokalen Lymphknoten führt (Härle et al., zur Publikation angenommen). Die Milz- und Lymphknotenzellen spätsympathektomierter arthritischer Mäuse hingegen hatten eine signifikant höhere TNF- und INF- γ -Sekretion im Vergleich zu den nicht-sympathektomierten Tieren. Dies verdeutlicht, dass das sympathische Nervensystem in den verschiedenen Phasen der Erkrankung die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine in den lymphatischen Organen moduliert und somit in einer frühen Phase der Erkrankung zu einer Verstärkung der Entzündung und in der chronischen Phase zu einer Hemmung der induzierten Arthritis führt. Der bei der RA beobachtete Verlust an sympathischen Nervenfasern (Miller et al., 2000; Miller et al., 2002) hat demnach einen entzündungsfördernden Effekt.

Nun soll auf die Wirkungen der sympathischen Neurotransmitter (vor allem Adenosin und Noradrenalin) näher eingegangen werden. Noradrenalin bindet an α - und β -Rezeptoren verschiedener Immunzellen und löst dort unterschiedliche Reaktionen aus. In niedriger Konzentration bindet es vor allem an α -Rezeptoren. Dies bewirkt in Makrophagen eine vermehrte TNF-Produktion

(Spengler et al., 1990). Noradrenalin und Adrenalin führen über einen α_2 -adrenergen Mechanismus zu einer Verschiebung der Synoviozytenpopulation. So erhöhen sie die Anzahl der makrophagenähnlichen Synovialzellen wohingegen die Synoviozyten vom Typ B durch Noradrenalin und Adrenalin vermindert werden (Mishima et al., 2001). Bei hohen Konzentrationen bevorzugt Noradrenalin die Bindung an β -Rezeptoren. Die Stimulation dieser Rezeptoren führt dagegen zu einer Reduktion der Sekretion von TNF aus LPS-stimulierten Makrophagen und erhöht die Expression des T-Zell-Rezeptors (Guirao et al., 1997; Haskó et al., 1998). Noradrenalin inhibiert neben TNF auch die Produktion von IL-6 und IL-8 von synovialen Zellen (Miller et al., 2002). Dieser suppressive Effekt auf die TNF- und IL-8-Sekretion wird in RA-Synoviozyten durch Kortikosteroide verstärkt (Straub et al., 2002). Weiterhin vermindert die Gabe eines β_2 -Agonisten die IFN- γ - und IgG_{2a}-Produktion aus murinen T_H1- bzw. B-Zellen (Sanders et al., 1997). Im Kollagen II induzierten Arthritis-Tiermodell zeigt sich der antiinflammatorische Einfluss des β_2 -adrenergen Agonisten Salbutamol. Die mit dieser Substanz behandelten Tiere weisen einen deutlich mildereren Krankheitsverlauf auf als die Kontrollgruppe. Die Autoren führen diese Beobachtung auf die verminderte IL-12 und TNF-Produktion aus Peritonealmakrophagen und eine erniedrigte IFN- γ -Sekretion aus den Lymphknoten der mit Salbutamol behandelten Tiere zurück (Malfait et al., 1999). Ein weiterer Mechanismus der Wirkung sympathischer Neurotransmitter über den β -adrenergen Rezeptor ist der chemotaktische Effekt von Noradrenalin, Neuropeptid Y (NPY) und dem β -Agonisten Isoproterenol auf Monozyten, der bei Gabe von α -Agonisten nicht zu beobachten war (Straub et al., 2000). Neben Noradrenalin moduliert auch NPY verschiedene immunologische Aspekte wie die Aktivierung natürlicher Killerzellen, die Zytokinsekretion aus Monozyten und die Differenzierung von T-Zellen (Bedoui et al., 2003). Auf Grund der Irrelevanz in dieser Arbeit wird jedoch hier nicht näher darauf eingegangen.

Ein weiterer sympathischer Neurotransmitter ist Adenosin. Es interagiert mit Adenosin-Rezeptoren und führt über eine cAMP-Erhöhung zu vielen antiinflammatorischen Effekten (A₂). So hemmt es die TNF- und IL-12-Produktion aus humanen Monozyten und aus Makrophagen der Ratte und

steigert die IL-10-Sekretion aus humanen Monozyten (Le Moine et al., 1997; Link et al., 2000; Ritchie et al., 1997). Weiterhin hemmt Adenosin die Aktivität zytotoxischer T-Zellen und natürlicher Killerzellen (Priebe et al., 1988). Hohe Konzentrationen an Adenosin führen zu einer verminderten Leukozytenakkumulation im Entzündungsareal und vermindern somit den Entzündungsgrad (Cronstein et al., 1995). Insgesamt zeigen sympathische Neurotransmitter vielfältige Wirkungen auf das Immunsystem, die bei entzündlichen Prozessen von Bedeutung sind. Hinsichtlich des großen Einflusses und der Bedeutung sensibler und sympathischer Nervenfasern mit ihren Neurotransmittern wird bei der RA (und anderen Entzündungen) von einer „neurogenen Entzündung“ gesprochen (Konttinen et al., 1994; Matucci-Cerinic et al., 1998).

1.5.3 Nerven-abstoßende Faktoren und Nervenwachstumsfaktoren

Die Ursache der Dissoziation der Dichte an sympathischen und sensiblen Nervenfasern (Verlust der sympathischen bzw. Erhöhung der sensiblen Fasern) bei der RA ist bislang unbekannt. Eine Rolle hierbei könnte das Verhältnis von Nerven-abstoßenden Faktoren und Nervenwachstumsfaktoren spielen (Konttinen et al., 1994). Kürzlich wurde gezeigt, dass der sympathische Nerven-abstoßende Faktor Semaphorin 3C im Synovium von Patienten mit RA im Vergleich zu OA und gesunden Kontrollpersonen hochreguliert wird. Dies konnte für Nerven-abstoßenden Faktoren des sensiblen Nervensystems nicht beobachtet werden (Miller et al., 2004). Diese Studie erklärt möglicherweise den Verlust an sympathischen Nervenfasern im Synovialgewebe bei RA im Vergleich zu OA und Patienten ohne entzündliche Anzeichen im Synovium in dieser Studie. Jedoch gibt es keine Erklärung für die erhöhte Dichte sympathischer Nervenfasern bei OA-Patienten im Vergleich zu den anderen Gruppen. Neurotrophe Faktoren wie der *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), *nerve growth factor* (NGF), Neurotrophin-3, Neurotrophin 4/5 und der *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) spielen hierbei möglicherweise neben Nerven-abstoßenden Faktoren eine Rolle. Diese Neurotrophine haben neben ihrer Bedeutung bei der Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems auch die Aufgabe der Erhaltung der sensiblen

Nervenfasern im Gewebe (Kirstein und Fariñas, 2002). Allerdings ist der Effekt der Neurotrophine nicht spezifisch auf die sensiblen Nervenfasern beschränkt. Die Bedeutung der beiden Neurotrophine NGF und BDNF in entzündlichen Prozessen soll an dieser Stelle nun kurz beleuchtet werden. NGF wird in Verbindung mit mehreren inflammatorischen Erkrankungen gebracht und wird bei Entzündungen der Haut (Shu und Mendell, 1999), der Lunge (Braun et al., 1999) und der RA (Aloe et al., 1992) hochreguliert. Durch den neurotrophen Effekt des NGF auf beide Nervenfasertypen muss jedoch ein anderer Faktor für die Dissoziation der sympathischen und sensiblen Nervenfasern im Synovialgewebe von RA-Patienten verantwortlich sein. BDNF – ein weiteres Neurotrophin – wird eher in den Zusammenhang mit sensiblen Nervenfasern gebracht (Pezet et al., 2002). Weiterhin ist bekannt, dass BDNF nach einer akuten Entzündung zentral produziert wird und in die peripheren Gewebe transportiert wird (Bayas et al., 2002; Cho et al., 1997). Auch ist gezeigt worden, dass aktivierte Immunzellen nach Stimulation BDNF sezernieren (Barouch et al., 2000; Kerschensteiner et al., 1999). In entzündlichen Erkrankungen wie der akuten Pankreatitis, der Multiplen Sklerose oder der Enzephalitis ist ebenfalls BDNF nachgewiesen worden (Kerschensteiner et al., 1999; Toma et al., 2002). Die Rolle des BDNF bei OA oder RA ist bisher nicht untersucht worden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit waren, sowohl hormonale als auch neuronale Veränderungen bei der RA aber auch bei anderen chronischen Erkrankungen des Bindegewebes herauszustellen, die möglicherweise zur Pathogenese der Krankheiten beitragen. Darunter fallen Konversionsexperimente an gemischten primären Synovialzellen, um die lokale Umwandlung von Steroidhormonen im Gewebe durch die 11β HSD und die STS aufzuzeigen. Weiterhin sollten die Bedeutung unterschiedlich hydroxylierter Östrogene bei der RA und dem SLE aufgezeigt werden. Hinsichtlich der neuronalen Veränderungen war die Innervierung im Synovialgewebe von Patienten mit OA, RA und gesunden Kontrollpersonen und die Rolle des BDNF von Interesse. Bei zwei weiteren Erkrankungen des Bindegewebes sollten ebenfalls die sympathische und sensible Nervenfaserdichte bestimmt werden: bei Achillodynie- und Dupuytren-Patienten.

1.6.1 Hormonale Veränderungen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die lokale Deaktivierung und Reaktivierung des Kortisol und die Expression beider dafür zuständiger Enzyme der 11β HSD im Synovialgewebe von Patienten mit RA im Vergleich zu OA zu bestimmen. Weiterhin sollten verschiedene Substanzen, die möglicherweise einen Einfluss auf die Konversion haben könnten, getestet werden. Hierunter fallen z. B. einige Entzündungsmarker wie das TNF oder sympathische Neurotransmitter. Neben der Untersuchung des Kortisolmetabolismus in primären gemischten Synoviozyten von RA-Patienten sollte die Konversion in diesen Zellen zu einem weiteren antiinflammatorischen Hormon, dem DHEA, untersucht werden. Ferner sollte diese lokale Umwandlung von DHEAS zu DHEA in den Synovialzellen hinsichtlich eventueller die Konversion modulierender Substanzen untersucht werden. Ein zusätzlicher hormonaler Aspekt in der Pathogenese der RA und auch des SLE spielen die Östrogene. Die unterschiedlichen Effekte der 2α - und der 16α -hydroxylierten Östrogene ist in verschiedenen Studien gezeigt worden. Möglicherweise spielen beide Hormone mit ihren stark östrogenen bzw. antagonisierenden Wirkungen eine Rolle bei

Erkrankungen wie SLE oder RA, welche mit einer erhöhten Proliferation im Gewebe verbunden sind. Die vorliegende Arbeit sollte nun diesen Zusammenhang bei Patienten mit RA und SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen herausstellen. Dazu wurde die Konzentration der unterschiedlich hydroxylierten Metabolite im Urin gemessen.

1.6.2 Neuronale Veränderungen

In dieser Arbeit sollte erstmals an einer großen Patientengruppe die Dichte an sensiblen und sympathischen Nervenfasern im Synovium gesunder Patienten im Vergleich zu OA und RA bestimmt werden. Bei der gesunden Kontrollgruppe handelte es sich um Patienten mit einem akuten Knie Trauma, bei dem davon ausgegangen werden konnte, dass im Synovium keine krankhaften und entzündlichen Veränderungen vorhanden waren. Weiterhin sollte die Dichte an BDNF-positiven Zellen im Synovialgewebe aller drei Gruppen quantifiziert werden und in Beziehung zu der Nervenfaserdichte an sensiblen und sympathischen Nervenfasern gesetzt werden, um so möglicherweise eine Erklärung für die Dissoziation der beiden Nervenfasertypen zu finden.

Auch bei Patienten mit Achillodynie und Morbus Dupuytren sollte im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen die Dichte an sympathischen und sensiblen Nervenfasern in der Achillessehne bestimmt werden. Die Pathogenese bei diesen Erkrankungen ist weitgehend unklar. Möglicherweise spielen SP⁺ Nervenfasern dabei eine Rolle, da bekannt ist, dass sensible Nervenfasern im Entzündungsgebiet (Miller et al., 2000) oder bei Wundheilungen (Lai et al., 2002; Wolf et al., 2001) vermehrt vorhanden sind. Das Ziel war es, die Dichte beider Nervenfasertypen im Sehnen- bzw. Faszien- bzw. Fasziengewebe bei Patienten mit Achillodynie und Morbus Dupuytren im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zu bestimmen und Zusammenhänge mit der Infiltration verschiedener Entzündungszellen herzustellen.

2 Material und Methoden

2.1 Tabellarische Zusammenfassung der angewandten Methoden

In Tabelle 3 sind alle wichtigen benutzten Methoden zusammengefasst. Es kann daraus entnommen werden, in welcher Publikation eine nähere Beschreibung zu finden ist oder ob eine ergänzende Beschreibung folgt.

Tab. 3: Tabellarische Zusammenfassung der angewandten Methoden. M1 – M6 = Beschreibung der Methode im jeweiligen Manuskript, E = ergänzende Beschreibung im Kapitel Material und Methoden.

Histologische Bestimmungen	
HE-, Giemsa- und Turnbull-Blau-Färbung, CD68 ⁺ und CD163 ⁺ Makrophagen, CD3 ⁺ T-Zellen, CD20 ⁺ B-Zellen, CD45 ⁺ Leukozyten, CD117 ⁺ Mastzellen, S100 ⁺ Granulozyten, Kollagen IV ⁺ Blutgefäße, Prolyl-4-Hydroxylase ⁺ Fibroblasten	M1, M2, M4, M5, M6
Steroidkonvertierende Enzyme: STS, 11 β HSD 1, 11 β HSD 2	M1, M2
TH ⁺ und SP ⁺ Nervenfasern sowie TH ⁺ und BDNF ⁺ Zellen	M1, M2, M4, M5, M6
In-situ-Hybridisierung	
BDNF	M4
Superfusion	
Superfusion von Synovialgewebe	M1, M2
Konzentrationsbestimmungen per ELISA	
Zytokine: IL-6, IL-8, TNF	M1, M2
Steroidhormone: 16 α -Hydroxyestron, 2 α -Hydroxyestron, 2 α -Hydroxyestradiol, 2 α -Hydroxyestriol	M3

Zellisolation und Zellkultur	
Gewinnung der primären Synovialzellen	M1, M2
Zellkultur der L929 Zellen	M2
Bioassays	
Bioassay mit TNF-sensitiven L929 Zellen	M2
LIVE/DEAD-Assay	E
Steroidkonversionen	
Konversion von DHEAS zu DHEA	M2
Konversion von Kortisol zu Kortison	M1

2.2 Patienten und Patientenmaterial

In den vorliegenden Manuskripten wurde Material von Patienten mit RA, SLE, OA, Achillodynie, Morbus Dupuytren sowie von gesunden Kontrollpersonen untersucht. Alle Patienten wurden über den Zweck der Studien unterrichtet und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studien wurden durch das Ethikkomitee der Universität Regensburg genehmigt. Die klinischen Daten sowie die Medikation der Patienten wurden aufgezeichnet. Zur Bestimmung der hydroxylierten Östrogene im Urin wurden Urinproben am Morgen und zusätzlich ein 24 Stunden Urin gesammelt. Entsprechende Aliquots wurden bis zur weiteren Verwendung bei -30°C aufbewahrt. Das Synovialgewebe wurde im Rahmen von Kniegelenkersatzoperationen oder Arthroskopien entnommen, in Natriumchloridlösung gekühlt ins Labor transportiert und dort für die unterschiedlichen Untersuchungen (Histologie, Superfusion, Gewinnung der primären Synoviozyten) vorbereitet. Für die Bestimmung der sympathischen und sensiblen Nervenfaserdichte bei Patienten mit Achillodynie und Dupuytren wurden Achillessehne- bzw. Handfaszienproben im Zuge routinemäßiger histologischer Untersuchungen entnommen.

2.3 Histologie

Die immunhistologischen Bestimmungen wurden an Aceton, Aceton-Methanol oder Formaldehyd fixierten Gefrierschnitten sowie an Formaldehyd fixierten Paraffinschnitten durchgeführt. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die markierten Antigene, die verwendeten Fixierungen, Antigene, Detektionssysteme und Substrat-Chromogenlösungen.

Tab. 4: Übersicht über die immunhistologischen Methoden. C = Gefrierschnitt, P = Paraffinschnitt, A = Aceton fixiert, AM = Aceton-Methanol fixiert, F = Formaldehyd fixiert, APAAP = Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase.

Markierung	Antigen	Firma	Einbettung	Fixierung	Detektionssystem	Substrat-Chromogenlösung
11 β HSD 1	11 β HSD 1	Santa Cruz Bio-technology, Santa Cruz, USA	C	AM	Alkalische Phosphatase, Immunfluoreszenz	BCIP/NBT, Alexa Fluor® 555
11 β HSD 2	11 β HSD 2	Alpha Diagnostic Int., San Antonio, USA	C	A	Alkalische Phosphatase, Immunfluoreszenz	BCIP/NBT, Alexa Fluor® 555
BDNF	BDNF	Abcam, Cambridge, GB	C	A, F	APAAP, Immunfluoreszenz	Fast Red, Alexa Fluor® 555
Blutgefäße	Kollagen IV	DakoCytomation, Hamburg	C	A	APAAP	Fast Red
B-Zellen	CD20	DakoCytomation, Hamburg	P	F	Streptavidin-Biotin-Peroxidase	3,3'Diaminobenzidin
Fibroblasten	Prolyl-4-Hydroxylase	DakoCytomation, Hamburg	C	A, AM	Immunfluoreszenz	Alexa Fluor® 488
Granulozyten	S100	DakoCytomation, Hamburg	P	F	Streptavidin-Biotin-Peroxidase	3,3'Diaminobenzidin
Leukozyten	CD45	DakoCytomation, Hamburg	P	F	Streptavidin-Biotin-Peroxidase	3,3'Diaminobenzidin
Makrophagen	CD163	DakoCytomation, Hamburg	C	A, AM	APAAP	Fast Red
Makrophagen	CD68	DakoCytomation, Hamburg	P	F	Streptavidin-Biotin-Peroxidase	3,3'Diaminobenzidin
Mastzellen	CD117	DakoCytomation, Hamburg	P	F	Streptavidin-Biotin-Peroxidase	3,3'Diaminobenzidin
Sensible Nervenfasern	SP	Chemicon, Temecula, USA	C, P	F	Immunfluoreszenz	Alexa Fluor® 546
Sympathische Nervenfasern	TH	Chemicon, Temecula, USA	C, P	F	Immunfluoreszenz	Alexa Fluor® 546
STS	STS	B. Ugele, Universität München	C	A	Immunfluoreszenz	Alexa Fluor® 555
T-Zellen	CD3	DakoCytomation, Hamburg	C, P	A, F	APAAP, Streptavidin-Biotin-Peroxidase	Fast Red, 3,3'Diaminobenzidin

BDNF wurde zusätzlich mittels *in-situ*-Hybridisierung im Synovialgewebe von OA und RA Patienten nachgewiesen. Diese Untersuchung wurde von Michael Harbuz, Department of Clinical Medicine, University of Bristol, UK, durchgeführt. Als histologische Färbemethoden wurden die HE-, die Giemsa- und die Turnbull-Blau-Färbung verwendet. Die quantitative Auswertung der positiv gefärbten Strukturen ist den jeweiligen Manuskripten zu entnehmen.

2.4 Superfusion

Die Sekretion der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF aus dem Synovialgewebe wurde mit Hilfe der Superfusion bestimmt. Diese Methode wurde von Prof. Straub ursprünglich zur Untersuchung der Nerv-/Immunzell-Interaktion im murinen Milzgewebe entwickelt (Straub et al., 1995) und auch auf das humane Synovialgewebe angewendet (Miller et al., 2000). Mit Hilfe der Superfusion kann sowohl die Freisetzung verschiedener Substanzen aus dem Gewebeverband als auch die Veränderung dieser durch verschiedene Wirkstoffe ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden Synovialgewebestückchen mit einer Größe von ca. 16mm² mit Medium bei einer konstanten Durchflussrate von 66µl/min superfundiert. Im aufgefangenen Zwei-Stunden-Superfusat konnte dann die Konzentration der Zytokine bestimmt werden.

2.5 Bestimmung der Zytokin- und Hormonkonzentrationen im Superfusat und Urin

Die Zytokin- und Hormonkonzentrationen im Superfusat und Urin wurde mittels ELISA bestimmt. Die Durchführung erfolgte entsprechend Arbeitsanleitungen der ELISA-Kits. Eine Übersicht der verwendeten Kits zeigt Tabelle 5.

Tab. 5: Übersicht der verwendeten ELISA-Kits.

ELISA	Firma	Bestimmung im
Estramet 2/16	IBL, Hamburg	Urin
OptEIA TM Set: Human IL-6	PharMingen, San Diego, USA	Superfusat
OptEIA TM Set: Human IL-8	PharMingen, San Diego, USA	Superfusat
TNF, hochsensitiv	R&D Systems, Wiesbaden	Superfusat

2.6 Zellisolation und Zellkultur

Die gemischten Synovialzellen wurden aus frischem Synovialgewebe durch enzymatischen Verdau isoliert. Diese so gewonnenen primären Synovialzellen wurden in serumfreiem RPMI 1640 resuspendiert und entweder sofort für die Konversion von DHEAS zu DHEA verwendet oder in Teflonbeuteln auf Eis nach Jena ans Institut für Biochemie der Friedrich-Schiller-Universität verschickt. Dr. Martin Schmidt untersuchte dort die Steroidkonversion von Kortisol zu Kortison.

2.7 Bioassays

Um den TNF-neutralisierenden Effekt der polyklonalen Immunglobuline zu testen, wurden TNF-sensitive murine L929 Fibrosarkomzellen unter Zugabe von Actinomycin D mit verschiedenen Konzentrationen von TNF (0-625 pg/ml) zusammen mit den folgenden Konzentrationen an IgG und Infliximab inkubiert: 0.01 und 0.1 pg/ml. Die Überlebensrate der Zellen wurde mittels eines CellTiter 96[®] AQueous Assay (Promega Corporation, Madison, USA) ermittelt.

Um eventuelle Toxizität zugegebener Substanzen auf die Zellen auszuschließen, wurde bei allen Zellkulturexperimenten der LIVE/DEAD[®]-Viability-Cytotoxicity-Assay durchgeführt (Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Dazu wurden die Zellen mit den Substanzen Calcein AM (2µM) und Ethidium Homodimer-1 (4µM) für 30 Minuten inkubiert. Calcein AM wird von intakten Zellen aufgenommen und durch eine zelleigene Esterase in das grün fluoreszierende Calcein umgewandelt. Ethidium-Homodimer-1 kann hingegen nur durch zerstörte Zellmembranen in die Zellen gelangen und dort an die DNS binden. Die toten Zellen zeigen nun eine intensiv rote Fluoreszenz. Zur Quantifizierung wurden im Fluoreszenzmikroskop pro Bedingung die Anzahl an lebenden und toten Zellen in drei Gesichtfeldern bestimmt. Die Überlebensrate der Zellen lag immer zwischen 80 und 90 Prozent.

2.8 Steroidkonversionen

Für die Untersuchung der Steroidkonversionen wurden die primären Synovialzellen mit radioaktiv markierten Substraten (0,2µM [1,2,6,7-³H]-DHEAS, 0,249µM [4-¹⁴C]-Kortisol) allein und unter Anwesenheit bestimmter, die Konversionen modulierender, Substanzen für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert. Die verwendeten Substanzen sind mit ihren Konzentrationen in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Tab. 6: Verwendete Substanzen für die Steroidkonversionen.

Substanz	Firma	Eingesetzte Konzentration
Konversion von DHEAS zu DHEA		
IgG Gammonativ [®]	Pharmacia & Upjohn, Erlangen	0.01 und 0.1 µg/ml
Infliximab	Essex Pharma GmbH, München	0.01 und 0.1 µg/ml
rmOSMβ-Rezeptor/ Fc-Chimäre	R&D Systems, Wiesbaden	0.01 und 0.1 µg/ml
Konversion von Kortisol zu Kortison		
Adenosin	Sigma-Aldrich, Steinheim	2.5 x 10 ⁻⁵ M
Carbenoxolon	Sigma-Aldrich, Steinheim	5 µM
Infliximab	Essex Pharma, München	3 µg/ml
Isoproterenol	Sigma-Aldrich, Steinheim	10 ⁻⁵ M
L-703,606	Sigma-Aldrich, Steinheim	10 ⁻⁶ M
Metyrapon	Sigma-Aldrich, Steinheim	100 µM
SP	Sigma-Aldrich, Steinheim	10 ⁻⁹ M
TNF	PeproTech, Rocky Hill, USA	10 ng/ml

Die Steroide wurden aus dem Überstand mit Ethylacetat extrahiert, vom Lösungsmittel befreit und in Ethanol gelöst. Mit Hilfe zweier Dünnschichtchromatographiesysteme (Kortisol zu Kortison: Chloroform : Ethylacetat : Ethanol 20:5:1; DHEAS zu DHEA: Chloroform : Diethylether 1:1, beide auf Kieselgelplatten) wurden die Steroide getrennt und die Spots mit Hilfe eines Phosphorimagers ausgewertet.

Zur Bestimmung der Aktivität der Reduktaseaktivität der 11βHSD 1 wurde der spezifische Inhibitor Metyrapon eingesetzt (Kumar et al., 1997). Dadurch

wurde die Reaktion von inaktivem Kortison zum aktiven Kortisol gehemmt. Um nun dieses Ausmaß an Reaktivierung zu messen, wurde ein Verhältnis zwischen Kortisonproduktion unter Metyraponeinfluss und Kortisonbildung ohne Hemmstoff gebildet. Diese Formel lautet demnach folgendermaßen:

$$\text{Reaktivierungsquotient} = \frac{\text{Kortison}_{\text{Metyrapon}}}{\text{Kortison}}$$

Dieser Quotient wird nun als Maß für die Kapazität der Zellen herangenommen, Kortison wieder zu Kortisol zu reaktivieren.

2.9 Statistische Auswertung der Daten

Alle Ergebnisse wurden mit SPSS / PC, Version 11.5, SPSS Inc., Chicago, USA ausgewertet. Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Gruppenmittelwerte wurden mittels der folgenden Tests verglichen: t-Test, Mann-Whitney-Test, Wilcoxon-Test. Korrelationen wurden mit der Spearman Rank Korrelationsanalyse ermittelt. Eine ROC-Analyse (*receiver operator characteristic*) wurde angewendet, um einen Trennwert des Reaktivierungsquotienten zwischen beiden Gruppen (OA und RA) zu errechnen. Bei allen Statistiken galt ein p-Wert kleiner als 0.05 als signifikant.

2.10 Eigener Arbeitsanteil an den verschiedenen Manuskripten

M1 Reduced capacity for the re-activation of glucocorticoids in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum.*, in Revision.

- Vorbereitung des Synovialgewebes
- Superfusion des Synovialgewebes
- Gewinnung der Synovialzellen
- Histologische und immunhistologische Bestimmungen

- M2 TNF inhibits dehydroepiandrosterone (DHEA) sulfate to DHEA conversion in rheumatoid arthritis synovial cells – a prerequisite for local androgen deficiency. *Arthritis Rheum.*, in Revision.
- Vorbereitung des Synovialgewebes
 - Superfusion des Synovialgewebes
 - Gewinnung der Synovialzellen
 - Steroidkonversionsexperimente (zur Hälfte von Soňa Struharova durchgeführt)
 - Histologische und immunhistologische Bestimmungen
 - Bioassay mit TNF-sensitiven L929 Zellen
- M3 Patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus have increased renal excretion of mitogenic estrogens in relation to endogenous antiestrogens. *J Rheumatol.* 2004; 31:489-494.
- Einfrieren und Aliquotieren des Probenmaterials
 - ELISA der Hormone im Urin
- M4 Low density of sympathetic nerve fibers and increased density of brain derived neurotrophic factor – positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis.*, zur Publikation angenommen.
- Betreuung der immunhistologischen Arbeiten von Christoph Holzer: TH- und SP-Bestimmung im gesunden Synovialgewebe sowie die Durchführung der BDNF-Immunhistologie an Patienten mit RA, OA und gesunden Kontrollpersonen
 - Vorbereitung des Synovialgewebes von Patienten mit RA und OA
 - Immunhistologische Bestimmungen der Nervenfaserdichte und TH-positiven Zellen bei Patienten mit RA und OA sowie die immunhistochemischen Doppelfärbungen
- M5 Achilles tendinosis is associated with sprouting of substance P – positive nerve fibers. *Ann Rheum Dis.*, zur Publikation angenommen.
- Immunhistologische Bestimmungen der Nervenfaserdichte

M6 Dupuytren's contracture is associated with sprouting of SP-positive nerve fibers and infiltration by mast cells., *J Rheumatol.*, zur Publikation eingereicht.

- Immunhistologische Bestimmungen der Nervenfaserdichte

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der verschiedenen Manuskripte sind im Folgenden zusammengefasst dargestellt. Die Grafiken und die exakten Daten sind den jeweiligen Publikationen im Anhang zu entnehmen.

3.1 Hormonale Veränderungen

Hinsichtlich der Aktivität der beiden Enzyme STS und 11 β HSD in primären gemischten Synovialzellen sowie der Exkretion hydroxylierter Östrogene sind Unterschiede bei den Patienten mit RA und SLE im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollpersonen festgestellt worden, die nun genauer dargestellt werden.

3.1.1 Steroidkonversion durch die 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase

Die untersuchten Patienten mit RA zeigten vergleichsweise höhere lokale Entzündungsparameter als Patienten mit OA (IL-6- und IL-8-Konzentration im Superfusat, Dicke der Deckzellschicht, absolute Zelldichte und Infiltration an CD3⁺ T-Zellen, CD163⁺ Makrophagen und Kollagen IV⁺ Gefäßen im Synovialgewebe).

Weitere immunhistologische Untersuchungen zeigten, dass beide Isoenzyme der 11 β HSD in synovialen Makrophagen exprimiert waren. Die 11 β HSD-positiven Zellen waren über alle Schichten des Synoviums verteilt. Die gemischten primären Synovialzellen konvertierten das zugegebene [4-¹⁴C]-Kortisol zu [4-¹⁴C]-Kortison. Diese Umwandlung war durch die Zugabe von Carbenoxolon – einem Inhibitor beider Isoenzyme – in OA Synoviozyten signifikant verringert ($p=0.018$). Auch bei den RA-Patienten zeigte sich mit Carbenoxolon eine Verringerung der Enzymaktivität, die allerdings nicht das Signifikanzniveau erreichte ($p=0.068$). Unter Metyraponeinfluss, einem spezifischen Hemmstoff der reduzierenden Eigenschaften der 11 β HSD 1 (Kumar et al., 1997), war die Bildung an Kortison in OA-Synoviozyten signifikant er-

höht, was in den gemischten Synovialzellen von RA-Patienten nicht zu beobachten war. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Reaktion vom inaktiven Kortison zum aktiven Kortisol in Synovialzellen von OA-Patienten wesentlich ausgeprägter vorhanden sein muss.

Auch der Reaktivierungsquotient (Kortisonproduktion unter Metyraponeinfluss : Bildung von Kortison ohne Hemmstoffe) war bei OA-Patienten im Vergleich zu RA-Patienten signifikant erhöht.

Die Medikation der Patienten zeigte keinerlei Einfluss auf den Reaktivierungsquotienten. Eine ROC-Analyse ergab einen Cut-off-Wert beider Gruppen bei einem Reaktivierungsquotienten von 1.93. Dies bedeutet, dass an Hand dieses Wertes die RA-Patienten von den OA-Patienten getrennt werden können, da der Reaktivierungsquotient bei den OA-Patienten oberhalb und bei den RA-Patienten unterhalb dieses Wertes lag.

Die immunhistologische Quantifizierung der 11 β HSD 1- und 2-positiven Zellen ergab ebenfalls Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Während die Isoenzym 2-positiven Zellen zwischen den beiden Patientengruppen nicht differierten, waren die 11 β HSD 1-positiven Zellen im Synovialgewebe von OA-Patienten signifikant erhöht. Das Verhältnis beider Isoenzyme (2/1) ergab ebenfalls einen erhöhten Wert für die Gruppe der OA-Patienten.

Da bekannt ist, dass die Zytokine TNF und IL-1 β einen Einfluss auf die 11 β HSD haben können (Cooper et al., 2001; Escher et al., 1997; Handoko et al., 2000; Tomlinson et al., 2001), wurden die ermittelten Entzündungsparameter der OA- und RA-Patienten mit den jeweiligen Reaktivierungsverhältnissen korreliert. Dies ergab eine signifikante Korrelation zwischen den Superfusatkonzentrationen an IL-6, IL-8, der Gesamtzell- sowie der T-Zelldichte und dem Reaktivierungsmaß. Das heißt, dass bei RA-Patienten die Reaktivierung des Kortisons zum Kortisol umso höher ist, je stärker die Entzündung im Synovialgewebe war. Bei den OA-Patienten konnte kein Zusammenhang zwischen dem Entzündungsstatus und dem Maß an Reaktivierung festgestellt werden. Da das Reaktivierungsverhältnis jedoch in den RA-Synoviozyten insgesamt geringer als bei den OA-Patienten war, erklärt der Zusammenhang zwischen der Entzündung und dem Maß an Reaktivierung nicht die verminderte Reaktivierung bei RA im Vergleich zu OA. Für diese

unterschiedliche Enzymaktivität muss es deshalb eine andere Ursache geben.

Der in früheren Studien (Miller et al., 2000; Miller et al., 2002) beobachtete Verlust an sympathischen Nervenfasern im Synovialgewebe bei Patienten mit RA im Vergleich zu OA konnte in dieser Studie bestätigt werden. Da dieser Rückzug der sympathischen Nervenfasern auch mit einer Reduzierung an sympathischen Neurotransmittern einherging und da die Interaktionen zwischen Glukokortikoiden und α - und β -Adrenorezeptoren bekannt war (Flugge, 1999; Korn et al., 1998), wurden diese zwei Rezeptoren mit den jeweiligen Agonisten stimuliert: Isoproterenol als β -Adrenorezeptor-Agonist und Adenosin in hoher Konzentration als Adenosin A₂-Adrenorezeptor-Agonist. Beide Substanzen inhibierten die Konversion von Kortisol zu Kortison in OA- und RA-Synoviozyten, was deutlich macht, dass sympathische Neurotransmitter einen Einfluss auf die oxidierenden Eigenschaften der 11 β HSD 1 oder 2 haben.

3.1.2 Steroidkonversion durch die Dehydroepiandrosteronsulfat-sulfatase

Wie in der vorhergehenden Studie wurde auch hier bei allen Patienten mit RA und OA histologische Entzündungsparameter (Dicke der Deckzellschicht, Dichte an Zellen, CD3⁺ T-Zellen, CD163⁺ Makrophagen, Kollagen IV⁺ Blutgefäße, TH⁺ Nervenfasern) im Synovialgewebe ermittelt. Insgesamt zeigten die Patienten mit RA höhere inflammatorische Marker als die Patienten mit OA. Die Synoviozyten beider Gruppen zeigten eine Umwandlung von zugegebenem DHEAS zu DHEA mit einer Rate von zirka fünf Prozent. Die Konversion war in den RA-Synovialzellen im Vergleich zu OA signifikant erniedrigt.

Eine Korrelationsanalyse mit den Entzündungsmarkern verdeutlichte den Zusammenhang zwischen der Konversion und verschiedenen Entzündungsparametern. Sowohl IL-6 im Superfusat als auch die Infiltration des Synoviums mit Makrophagen und T-Zellen zeigte bei den RA-Patienten negative Korrelationen mit dem Ausmaß der Konversion von DHEAS zu DHEA, die bei den OA-Patienten nicht zu beobachten war. Dies macht deutlich, dass die erhöhte Entzündung bei RA-Patienten zu einer verminderten Konversionsra-

te führt. Zwischen der Medikation und der Menge an gebildetem DHEA konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

Immunhistochemische Doppelfärbungen lokalisierten das für die Umwandlung zuständige Enzym Steroidsulfatase (STS) in CD163⁺ Makrophagen und Prolyl-4-Hydroxylase⁺ Fibroblasten im Synovium beider Patientengruppen. Da das inflammatorische Milieu möglicherweise die Konversion von DHEAS zu DHEA vermindert, und bekannt ist, dass TNF – einem wichtigen proinflammatorischen Zytokin bei der RA – diesen Schritt inhibieren kann (Hennebold und Daynes, 1994), wurde dieses Zytokin mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Infliximab blockiert. Dieser erhöhte die Konversion von DHEAS zu DHEA in Synovialzellen von Patienten mit RA, aber nicht bei Patienten mit OA. Polyklonales IgG als Kontrolle des F_{ab}-Fragmentes von Infliximab verstärkte ebenfalls die Konversion bei RA-Patienten.

Ob dieser Effekt durch die Aktivierung von Fc γ -Rezeptoren oder durch eine Neutralisierung von TNF durch die polyklonalen Immunglobuline zustande kam, wurde in weiteren Versuchen getestet. Um die Rolle der Fc γ -Rezeptoren zu testen, wurde in den Konversionsexperimenten ein chimäres Protein aus dem humanen Fc-Teil und der Onkostatin M Rezeptor β -Kette aus der Maus eingesetzt. Dieses murine Protein hat eine geringe Homologie zum humanen Protein und zeigt somit keine biologischen Wirkungen. Allein der Effekt des humanen Fc-Teiles werden so getestet. Die Zugabe dieser Chimäre veränderte die Konversionsrate weder bei RA noch bei OA-Patienten. Die möglichen neutralisierenden Eigenschaften der polyklonalen Immunglobuline wurden mit Hilfe von TNF-sensitiven L929-Zellen getestet.

Bei allen eingesetzten Konzentrationen von TNF (39-625 pg/ml) reduzierte sich die Überlebensrate dieser Zellen, was durch die Zugabe von Infliximab wieder aufgehoben werden konnte. Polyklonales IgG hemmte die Wirkung des TNF bei niedriger Konzentration (39 pg/ml), während bei höher konzentriertem TNF dieser Effekt nicht mehr zu beobachten war. Da die im Überstand der Synoviozyten gemessenen TNF-Konzentrationen unterhalb von 39 pg/ml lagen, ist die TNF-neutralisierende Wirkung der polyklonalen Immunglobuline sehr wahrscheinlich.

3.1.3 Steroidhormonmetabolite im Urin

In einer weiteren Studie wurde die Exkretion verschiedener Östrogenmetaboliten im Urin untersucht. Die Urinkonzentrationen der 2-hydroxylierten Östrogene waren unabhängig von einer Prednisolontherapie bei Patienten mit RA und SLE im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant niedriger. Die Ausscheidung dieser Östrogene war bei gesunden Kontrollen etwa 10-20 x höher. Bezüglich der 16-hydroxylierten Östrogene fand sich kein Unterschied zwischen beiden Krankheitsgruppen und gesunden Kontrollen. Bei Betrachtung des totalen Verlustes der 2- und 16-hydroxylierten Östrogene im Urin ergab sich ein ähnliches Bild. Unter Einbezug des Urinvolumens und der Sammelzeit war die Ausscheidung der 2-hydroxylierten Östrogene bei beiden Krankheitsgruppen signifikant vermindert. Während bei den RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen kein Unterschied bei dem totalen Verlust der 16-hydroxylierten Östrogene bestand, war dies bei den SLE-Patienten mit Prednisolontherapie der Fall.

Um den relativen Anstieg der 16-hydroxylierten Östrogene im Verhältnis zu den 2-hydroxylierten Östrogenen zu bestimmen, wurde eine Ratio zwischen den verschiedenen hydroxylierten Metaboliten gebildet (16-hydroxylierte/2-hydroxylierte Östrogene). Dieser Quotient war bei beiden Patientengruppen mit und ohne Einnahme von Prednisolon um mehr als das 20fache im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen erhöht. Somit ist im Verhältnis zu den 2-hydroxylierten Östrogenen die Exkretion der 16-hydroxylierten Metabolite deutlich erhöht. Es konnte weder zwischen RA und SLE noch zwischen den Geschlechtern in allen drei Gruppen hinsichtlich der Konzentrationen der hydroxylierten Metabolite, dem absoluten Verlust und der Ratio ein Unterschied festgestellt werden. Die Konzentrationen der ausgeschiedenen Metabolite im Urin hingen bei den RA-Patienten nicht mit klinischen Parametern wie der Anzahl an geschwollenen Gelenken zusammen. Bei den Patienten mit SLE hingegen korrelierte die Exkretion an 2-hydroxylierten Östrogenen mit der Krankheitsaktivität.

3.2 Neuronale Veränderungen

In diesem Abschnitt wird nun die Innervierung des Synovialgewebes bei gesunden Kontrollen im Vergleich zu Patienten mit RA und OA sowie deren Zusammenhänge mit dem Vorkommen des BDNF dargestellt. Weiterhin werden die Ergebnisse der sympathischen und sensiblen Nervenfaserdichte bei Patienten mit Achillodynie und Morbus Dupuytren im Vergleich zu Kontrollpersonen vorgestellt und in Beziehung zur Infiltration mit Entzündungszellen gesetzt.

3.2.1 Sensorische und sympathische Nervenfaserdichte im Synovium von gesunden Kontrollen, Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis

Die Dichte an sensiblen Nervenfasern war im Synovialgewebe von Patienten mit OA im Vergleich zu den Patienten mit RA und mit akuten Traumata reduziert. Hinsichtlich der sympathischen Innervierung zeigte sich – wie schon in früheren Studien berichtet (Miller et al., 2000; Miller et al., 2002) – eine deutliche Verminderung der TH⁺ Nervenfasern im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Zwischen den Patienten mit OA und den Kontrollpersonen bestand kein Unterschied in der sympathischen Nervenfaserdichte. Das Verhältnis beider Nervenfasern (TH/SP) war in der Gruppe der RA-Patienten im Vergleich zu den Patienten mit OA und den Kontrollpersonen ohne entzündliche Anzeichen reduziert. Zwischen der Gruppe mit OA und der mit akuten Traumata zeigte sich ein signifikant höheres Verhältnis von TH⁺ zu SP⁺ Nervenfasern bei den Patienten mit OA. Damit hatte die OA-Gruppe die höchste Dichte an sympathischen Nervenfasern im Verhältnis zu sensiblen Nervenfasern. Eine Korrelationsanalyse ergab eine positive Beziehung zwischen beiden Nervenfasern bei den Kontrollen und bei Patienten mit OA. In der Gruppe der RA-Patienten hingegen war die Dichte an sympathischen mit der an sensiblen Nervenfasern negativ korreliert. Obwohl die Patienten mit akutem Trauma wesentlich jünger waren, existierte weder hinsichtlich des Alters noch des Geschlechts eine Beziehung zu der Dichte an SP oder TH positiven Nervenfasern in allen drei Gruppen.

3.2.2 Der *Brain derived neurotrophic factor* und die Innervation im Synovialgewebe

Da möglicherweise neurotrophe Faktoren wie BDNF einen Einfluss auf die eben aufgezeigte unterschiedliche Innervierung haben könnten, wurde die Expression dieses Faktors im Synovium der drei Patientengruppen untersucht.

Eine *in-situ* Hybridisierung zeigte positive mRNA im Synovium von Patienten mit RA und OA. BDNF wurde immunhistochemisch in allen drei Gruppen nachgewiesen. Mit Hilfe einer immunhistologischen Doppelfärbung konnte der neurotrophe Faktor in Fibroblasten und CD163⁺ Makrophagen lokalisiert werden. Eine Quantifizierung der BDNF positiven Zellen zeigte eine signifikant höhere Anzahl im Synovialgewebe von Patienten mit RA und OA im Vergleich zu den Kontrollen.

Dies verdeutlicht, dass BDNF vermutlich unter inflammatorischen Bedingungen exprimiert wird. Die Anzahl an BDNF⁺ Zellen korrelierte bei den Patienten mit OA und den Kontrollen positiv mit dem Nervenfaserverhältnis. Diese Beziehung war in der Gruppe der RA-Patienten nicht vorhanden.

3.2.3 Sympathische und sensible Nervenfaserdichte bei anderen chronischen Erkrankungen des Bindegewebes: Achillodynie und Morbus Dupuytren

Die Achillessehnenproben der Patienten mit Achillodynie waren in hohem Maße infiltriert mit CD3⁺ T-Zellen, CD20⁺ B-Lymphozyten, CD68⁺ Makrophagen und Hämosiderophagen. In diesem Granulationsgewebe fanden sich auch fibröse Strukturen und Kapillargefäße. Bei den Patienten mit Rupturen waren Entzündungszellen entweder gar nicht vorhanden (B-Zellen und Eisen⁺ Zellen) oder im Vergleich zu den Patienten mit Achillodynie signifikant vermindert (T-Zellen und Makrophagen).

Das Achillessehnenngewebe von Patienten mit Ruptur war jedoch im Vergleich zu den Achillodyniesehnen hoch infiltriert mit Granulozyten. Hinsichtlich der Dichte an sensiblen Nervenfasern unterschieden sich die beiden Patientengruppen deutlich voneinander. Das Sehnenngewebe der Achillodynie-

patienten hatte signifikant mehr SP⁺ Nervenfasern pro mm² als das der Patienten mit Ruptur (1.06 vs. 0.35 SP⁺ Nervenfasern/mm²; p=0.006).

Die Anzahl der TH⁺ sympathischen Nervenfasern zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl positiver Nervenfasern und der Infiltration mit B-, T-Zellen, Makrophagen oder Hämosiderophagen festgestellt werden.

Das Faszien­gewebe der Patienten mit Morbus Dupuytren war im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen stark infiltriert mit Mastzellen. Diese Entzündungszellen waren oft assoziiert mit fibrösen Strukturen oder kleinen Blutgefäßen.

Die Dichte an sensiblen Nervenfasern war bei den Patienten mit Morbus Dupuytren im Vergleich zu gesundem Faszien­gewebe signifikant erhöht. Eine Korrelationsanalyse ergab eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an Mastzellen und sensiblen Nervenfasern im Gewebe. Sympathische Nervenfasern konnten in keiner Patientengruppe nachgewiesen werden.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit haben sich verschiedene Ergebnisse hinsichtlich der hormonalen und neuronalen Veränderungen bei Patienten mit OA, RA, Achillodynie und Dupuytren und den jeweiligen Kontrollpersonen gezeigt. Sie werden nun in ihren Zusammenhängen diskutiert.

4.1 Hormonale Veränderungen

Das immunsuppressive Kortisol ist bei Patienten mit RA im Serum nicht vermindert (Cutolo et al., 1999; Kanik et al., 2000). Allerdings ist seine Sekretion in Relation zum Entzündungsmaß – gemessen zum Beispiel an den erhöhten IL-6- oder TNF-Spiegeln im Serum – nicht ausreichend (Straub et al., 2002b). Eine wichtige Rolle im Kortisolmetabolismus spielt die lokale Aktivierung bzw. Deaktivierung dieses Hormons durch die 11 β HSD. Im Falle einer akuten Infektion mit *Listeria monocytogenes* ist zum Beispiel die Degradation des Kortisols durch die Dehydrogenaseaktivität der 11 β HSD ein Schutzmechanismus, um die Maus vor bakterieller Invasion zu schützen. In dieser Studie konnte eine vermehrte bakterielle Besiedelung nach Hemmung der inaktivierenden Reaktion der Isoenzyme gezeigt werden (Hennebold et al., 1997). Diese lokale Konversion von Kortisol zu Kortison und umgekehrt ist möglicherweise auch bei chronischen Erkrankungen wie der RA von Bedeutung. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit in Synoviozyten untersucht.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Reaktivierung des Kortisons zum aktiven Kortisol in Synovialzellen von RA-Patienten im Vergleich zu den Patienten mit OA vermindert ist. Die lokale Verfügbarkeit an aktivem Kortisol ist somit bei beiden Gruppen sehr unterschiedlich. Durch den Inhibitor Carbenoxolon, der die Reaktionen beider Isoenzyme hemmt, konnte diese Inaktivierung aufgehoben werden. Dieser Hemmstoff wäre als Therapeutikum zur Erhöhung der lokalen Kortisolverfügbarkeit von Interesse, zumal in einem Tiermodell der Dermatitis die Kombination von Kortisol mit Carbenoxolon eine Verbesserung der Krankheitsaktivität demonstriert werden konnte (Hennebold und Daynes, 1998). Da die RA eine entzündliche Erkrankung ist, liegt die Ursache des vermehrten Abbaus von Kortisol im Gewebe womöglich an

dem Einfluss bestimmter Zytokine. Die Stimulation der 11 β HSD durch IL-1 oder TNF führte in mehreren Studien zu einer vermehrten Reaktivierung des inaktiven Kortisons (Cai et al., 2001; Escher et al., 1997; Quinkler et al., 2003; Tomlinson et al., 2001), was bei einer chronisch entzündlichen Erkrankung wie der RA von Vorteil wäre. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass proinflammatorische Faktoren bei der RA positiv mit dem Reaktivierungsausmaß korrelierten. Bei OA-Patienten war dies nicht der Fall. Es scheint also, als ob inflammatorische Aspekte eine Rolle bei der Enzymaktivität spielen würden.

Da die Entzündung im Synovium von RA-Patienten wesentlich ausgeprägter als bei OA-Patienten ist, erklärt dies nicht die wesentlich geringere Reaktivierungsrate in den RA-Synoviozyten. Somit muss es neben den proinflammatorischen Faktoren eine weitere Einflussmöglichkeit auf das Enzymsystem geben. Untersuchungen zur Innervierung des Synovialgewebes bei Patienten mit RA und OA demonstrierten einen dramatischen Verlust sympathischer Nervenfasern (Miller et al., 2000; Miller et al., 2002). Diese Veränderung hat möglicherweise einen Einfluss auf die lokale Konversion des Kortisols. Zusammenhänge zwischen dem Glukokortikoidmetabolismus und sympathischen Neurotransmittern sowie deren Rezeptoren sind in mehreren Studien beschrieben worden. So inhibiert zum Beispiel cAMP – ein *second messenger* des β -adrenergen Signalpfades – in Hautfibroblasten beide Isoenzyme der 11 β HSD (Hammami und Siiteri, 1991). Weiterhin steigert die Zugabe des sympathischen Neurotransmitters Adenosin in Leydigzellen die Reaktivierungsrate und hemmt die Dehydrogenaseaktivität (Ferguson et al., 1999). Diese Studien demonstrieren, dass das sympathische Nervensystem einen Einfluss auf die Enzymaktivität der 11 β HSD haben könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der β -Rezeptor Agonist Isoproterenol und Adenosin die lokale Verfügbarkeit des Kortisol erhöhen indem sie den Abbau verhinderten. Dieser Effekt war in den OA-Synoviozyten ausgeprägter vorhanden als bei den RA-Patienten und ist vermutlich auf eine geringere Anzahl der β -Rezeptorendichte auf den RA-Synovialzellen zurückzuführen (Baerwald et al., 1997). In mehreren Studien konnte der stimulierende Einfluss von Katecholaminen oder von β -Agonisten

auf den Glukokortikoidrezeptor beobachtet werden (Eickelberg et al., 1999; Korn et al., 1998; Schmidt et al., 2001). Dieser Effekt wird vermutlich über die β -Rezeptoren und cAMP vermittelt (DiBattista et al., 1991; Dong et al., 1989; Gruol et al., 1986). Ein cAMP-Anstieg in T-Zellen und Makrophagen führt wiederum zu einer Inhibierung proinflammatorischer Reaktionen wie der Proliferation von T-Zellen oder der TNF-Sekretion (Johnson et al., 1988; Renz et al., 1988). Umgekehrt können auch Glukokortikoide selbst in die Regulation der β -adrenergen Rezeptoren eingreifen (Motulsky und Insel, 1982) und durch Stimulation der Tyrosinhydroxylase die Produktion der Katecholaminsynthese erhöhen (Schubert et al., 1980). An Synovialzellen konnte der kooperative Effekt von Glukokortikoiden und Noradrenalin gezeigt werden. Die Inkubation mit beiden Substanzen führte zu einer verminderten TNF-, IL-8- und IL-6-Sekretion (Straub et al., 2002a). Neben diesen Zusammenhängen wäre der Einfluss sympathischer Neurotransmitter auf den Abbau des Kortisols eine weitere Verbindung dieser beiden Systeme. Der Verlust an sympathischen Nervenfasern zusammen mit einer Erniedrigung sympathischer Neurotransmitter und β -adrenerger Rezeptoren auf synovialen RA-Leukozyten führt möglicherweise zu der beobachteten geringen Kortisolverfügbarkeit im Synovium von RA-Patienten. Da auch synthetische Glukokortikoide von den 11β HSD-Enzymen metabolisiert werden, würden auch die Reaktivierung von Prednison vermindert werden. Möglicherweise läge in der Blockade der 11β HSD durch zum Beispiel Carbenoxolon eine Therapiemöglichkeit für Rheumapatienten.

Neben der Veränderungen im Kortisolmetabolismus sind bei der RA niedrige Serumspiegel an adrenalen Androgenen gemessen worden (Deighton et al., 1992; Kanik et al., 2000; Sambrook et al., 1998; Vogl et al., 2003). Verminderte DHEAS-Konzentrationen sind in der Gruppe der prämenopausalen Frauen bereits vor dem Ausbruch der Krankheit festgestellt worden (Masi et al., 2000). Das im Blut zirkulierende DHEAS wird in den peripheren Geweben lokal mit Hilfe der Steroidsulfatase zu DHEA umgewandelt. Die antiinflammatorischen Eigenschaften des DHEA (Iwasaki et al., 2004; Kimura et al., 1998; Straub et al., 1998a; Tamagno et al., 1998) konnten in Tiermodellen der RA

bestätigt werden. So führte die orale Gabe von DHEA in arthritischen Mäusen zu einer signifikanten Verbesserung der Krankheitssymptome wie Gelenkschwellung oder auch histologischer Parameter (Röntzsch et al., 2004; Williams et al., 1997). Somit wären niedrige DHEAS-Spiegel im Serum bei einer chronisch entzündlichen Erkrankung wie der RA von Nachteil. Die lokale Umwandlung von DHEAS zu DHEA in Synovialzellen von Patienten mit RA im Vergleich zu OA sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden. Die Konversion des Tritium-markierten DHEAS zu DHEA war in den Synoviozyten im Vergleich zu OA signifikant vermindert. Dadurch ist das systemische Androgendefizit auch lokal im Synovium der RA-Patienten zu beobachten. Wie schon erwähnt, ist TNF ein möglicher Faktor, der diesen Konversionsschritt beeinflussen kann (Hennebold und Daynes, 1994). Die Blockade des TNF im Konversionsexperiment durch einen monoklonalen Antikörper zeigte einen signifikanten Anstieg der Konversionsrate bei RA-Patienten. Die anti-TNF-Therapie ist bei Patienten mit RA (Elliott et al., 1993) oder auch bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen (Braun et al., 2002; van Dulleman et al., 1995) schon erfolgreich eingesetzt worden. Eine TNF neutralisierende Therapie hätte somit auch den Vorteil einer erhöhten lokalen Verfügbarkeit antiinflammatorischer Androgene. Auf adrenaler Ebene hingegen konnte der positive Effekt der anti-TNF-Therapie auf die Produktion von DHEAS und DHEA nicht nachgewiesen werden (Straub et al., 2003).

Die immunhistochemischen Doppelfärbungen zeigten, dass das Enzym Steroidsulfatase in synovialen Makrophagen und zu einem geringeren Anteil in Fibroblasten exprimiert wird. Wie schon murinen Makrophagen gezeigt (Hennebold und Daynes, 1994) ist sind also hauptsächlich aktivierte Makrophagen im Synovium für die lokale Umwandlung von DHEAS zu DHEA verantwortlich. Da die Anzahl der Makrophagen im Synovialgewebe von RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten erhöht ist, muss die verminderte Konversionsrate von DHEAS zu DHEA durch eine Hemmung der Enzymaktivität oder -expression zu Stande kommen. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist TNF ein Inhibitor dieses Enzymschrittes. Eine weitere Therapiemöglichkeit zur Erhöhung der Konzentration antiinflammatorischer Androgene neben der anti-TNF-Therapie wäre die Supplementation. Da eine Monotherapie mit Glukokortikoiden durch die Hemmung der ACTH-

Sekretion die Verminderung der DHEA-Spiegel im Serum verstärkt, wäre eine Kombinationstherapie beider adrenaler Steroidhormone denkbar. Dadurch würden nicht nur die antiinflammatorischen Eigenschaften des DHEA einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben, sondern es würde womöglich auch die durch die Glukokortikoidgabe verursachte verminderte Knochendichte verbessern (Hartkamp et al., 2004; Robinzon und Cutolo, 1999; Straub et al., 2000c). Neben DHEA stehen weitere Metabolite zur Verfügung: Androstendiol, Androstendion, Testosteron oder Dihydrotestosteron. Auch bei diesen Steroidhormonen sind antiinflammatorische Wirkungen nachgewiesen (Carlsten et al., 1989; Dulos und Bagchus, 2001; Kanda et al., 1996; Kanda et al., 1997; Padgett und Loria, 1998). Eine Supplementierung mit diesen Androgenen oder Androgenanaloga sind sowohl im Tiermodell der RA (Harbuz et al., 1995; Röntzsch et al., 2004; Offner et al., 2004; Williams et al., 1997) als auch bei Patienten mit RA (Booij et al., 1996; Cutolo et al., 1991) mit einer Verbesserung der Krankheitsaktivität verbunden. Welches Androgen jedoch am Besten als Hormonersatztherapie eignen würde, ist unklar. Neue Ergebnisse zeigen, welche Steroide die Synovialzellen aus verschiedenen Androgenen bilden können. Daraus wird deutlich, dass vor allem aus Androstendion und Testosteron potente Androgene gebildet werden und dass – im Gegensatz zu dem Substrat DHEA – die Aromatisierung der Androgene zu den Östrogenen verhindert wird (Schmidt und Weidler et al., in Vorbereitung). Obwohl auch bei weiblichen RA-Patienten positive Effekte mit einer Testosterongabe erreicht worden sind (Booij et al., 1996), wird wohl auf Grund der unerwünschten Nebeneffekte der Androgentherapie wie Maskulinisierung oder Störung des Menstruationszyklus die Supplementation mit potenten Androgenen jedoch auf männliche RA-Patienten beschränkt bleiben.

Die Untersuchungen der verschieden hydroxylierten Östrogene bei Patienten mit RA und SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zeigen deutlich eine vermehrte Ausscheidung des 16 α -Hydroxyöstrons in Relation zu den 2 α -hydroxylierten Östrogenen. Die Herkunft dieser Metabolite spiegelt – wie schon in anderen Studien beschrieben (Meilahn et al., 1998; Muti et al., 2000) – ihre Produktion in den peripheren Geweben wieder. In Synovialflüs-

sigkeiten von RA-Patienten im Vergleich zu Patienten mit akutem Trauma sind erhöhte Konzentrationen an 16α -Hydroxyöstron gefunden wurden. Die Konzentration an 2α -hydroxylierten Metaboliten war hingegen in dieser Studie zwischen beiden Gruppen nicht unterschiedlich (Castagnetta et al., 2003). Daraus lässt sich schließen, dass die im Urin gefundenen hydroxylierten Östrogene aus dem Entzündungsgebiet von Patienten mit RA oder auch SLE stammen könnten. In *in vitro* Studien konnten die antiöstrogene Wirkung der 2-hydroxylierten Östrogene im Gegensatz zu den stark proliferativen Eigenschaften des 16α -Hydroxyöstrons gezeigt werden (Fishman und Martucci, 1980; Schneider et al., 1984). Die im Vergleich zum 17β -Östradiol stärkere östrogene Wirkung des 16α -Hydroxyöstrons führt bei einer Verminderung der 2α -hydroxylierten Östrogene zu einer vermehrten Proliferation im Gewebe. Diese Situation wurde in der Arbeit an Hand der Urinkonzentrationen der Metabolite des Östrogens aufgezeigt. Der Verlust an 2α -hydroxylierten Östrogenen ist möglicherweise die Ursache für die chronische Proliferation im entzündlichen Gewebe. Die negative Korrelation dieser Metabolite mit der Krankheitsaktivität bei SLE-Patienten bestätigt diese Annahme.

Möglicherweise sind die pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften der Östrogene nicht nur auf ihre Konzentration, sondern auch auf ihre Konversion zu hydroxylierten Metaboliten zurückzuführen. Die weitere Metabolisierung der Östrogene ist vielleicht auch die Ursache für die beobachteten unterschiedlichen Einflüsse von Hormonersatztherapien (Doran et al., 2004, Drossaers-Bakker et al., 2001; Hall et al., 1994). Da die Exkretion der hydroxylierten Östrogene weder vom Geschlecht noch vom Menstruationszyklus abhing, ist eine gonadale Produktion dieser Metabolite sehr unwahrscheinlich. Auch zeigt sich dieses Bild sowohl bei RA- als auch bei SLE-Patienten, was verdeutlicht, dass dieses Phänomen nicht krankheitsspezifisch ist, sondern in verschiedenen chronisch entzündlichen Systemerkrankungen eine Rolle spielen kann.

4.2 Neuronale Veränderungen

Verschiedene neuronale Veränderungen sind in dieser Arbeit bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen (OA, RA) und chronischen Verdickungen des Bindegewebes (Achillodynie, Dupuytren) im Vergleich zu den Kontrollpersonen beobachtet worden. Die unterschiedlichen Ergebnisse werden nun hier einzeln unter Berücksichtigung ihres jeweiligen Hintergrundes diskutiert.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass sich die sympathische Innervierung im Synovialgewebe von OA-Patienten nicht von der gesunder Personen ohne entzündliche Erkrankungen unterschied. Bei Patienten mit RA konnte der Verlust an sympathischen Nervenfasern im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (OA und Patienten mit akutem Trauma) bestätigt werden (Miller et al., 2000; Miller et al. 2002). Während in einem arthritischen Tiermodell die Reduktion der Nervenfasern abhängig von dem Erkrankungsstadium war (Imai et al., 1997), konnte in der vorliegenden Arbeit bezüglich der Entzündungsmarker im Gewebe oder der Krankheitsdauer kein Zusammenhang mit der sympathischen Nervenfaserdichte festgestellt werden. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass sich die Patienten mit RA in einem späten chronischen Stadium der Erkrankung befinden, in dem die sympathischen Nervenfasern fast verschwunden sind. Diese Situation dürfte im Entzündungsgebiet von Nachteil sein, da der Verlust sympathischer Fasern auch mit einer Reduktion sympathischer Neurotransmitter wie Noradrenalin und Adenosin einhergeht. Da diese beiden Neurotransmitter in hohen Konzentrationen antiinflammatorische Wirkungen aufweisen, wie die Verminderung der Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-6, IL-8 und IFN- γ aus verschiedenen Zellen des Immunsystems (Haskó et al, 1998; Le Moine et al., 1997; Link et al., 2000; Miller et al., 2002; Ritchie et al., 1997) oder die Verringerung der Produktion von Immunglobulinen (Sanders et al., 1997) zeigt, ist der Rückzug der sympathischen Fasern aus dem Entzündungsgebiet von Nachteil. Zusätzlich wirken niedrige Konzentrationen an Noradrenalin und Adenosin über α -Rezeptoren und A1 Adenosinrezeptoren

proinflammatorisch, wie zum Beispiel durch die Erhöhung der TNF-Produktion in Makrophagen (Mishima et al., 2001).

Auch das Verhältnis beider Nervenfasern zueinander zeigt eine deutliche Dominanz der proinflammatorischen sensiblen Fasern im Vergleich zu den sympathischen Nervenfasern bei RA. Während bei den nicht entzündlichen Kontrollpersonen und bei Patienten mit OA beide Nervenfasern positiv miteinander korrelierten, war dieser Zusammenhang bei den RA-Patienten negativ. An dieser Stelle stellt sich nun die Frage nach der Ursache für diese Dissoziation. Das Wachstum, der Erhalt und der Rückzug von Nerven in der Peripherie wird durch verschiedene Nervenwachstums- und Nerven-abstoßende Faktoren geregelt. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Präsenz von Semaphorin 3C, einem Nerven-abstoßenden Faktor des Sympathikus, im Synovium womöglich die Ursache für den Rückzug der sympathischen Nervenfasern bei der RA sind (Miller et al., 2004).

Daneben gibt es mehrere Nervenwachstumsfaktoren, die für die Dissoziation der Nervenfasern verantwortlich sein könnten. Erhöhte NGF-Spiegel sind bei Patienten mit RA und systemischer Sklerose in der Synovialflüssigkeit bzw. im Blut nachgewiesen worden (Aloe et al., 1992; Matucci-Cerinic et al., 2001) und NGF hat dort möglicherweise einen Einfluss auf die Leukozytendifferenzierung oder die Wundheilung (Li et al., 1980; Pezzati et al., 1992; Tuveri et al., 2000). BDNF hingegen wurde bisher weder beim Tier noch beim Menschen im Synovialgewebe nachgewiesen. Er wird nach entzündlichen Prozessen exprimiert (Bayas et al. 2002; Cho et al. 1997) und seine Produktion von Immunzellen ist ebenfalls beobachtet worden (Barouch et al., 2000; Kerschesteiner et al., 1999). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass BDNF-positive Zellen im entzündeten Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten, kaum hingegen in Patienten mit akutem Trauma gefunden wurden. Die BDNF-positiven Zellen stellten sich mit Hilfe der immunhistochemischen Doppelfärbung als Fibroblasten und Makrophagen heraus. Eine Korrelationsanalyse zwischen der Anzahl der BDNF-positiven Zellen und der Nervenfaserdichte ergab einen positiven Zusammenhang zwischen dem Verhältnis beider Nervenfasern zueinander (TH/SP) und der Dichte an BDNF-positiven Zellen bei gesunden Kontrollpersonen und OA-Patienten, nicht aber bei RA-Patienten. Möglicherweise unterstützt BDNF das Wachs-

tum der sympathischen mehr als das sensibler Fasern bei Patienten mit OA und akutem Trauma, während dies bei Patienten mit RA nicht der Fall ist. Die erhöhte Dichte an Semaphorin 3C, einem Nerven-abstoßenden Faktor der sympathischen Nerven, im Synovium von RA-Patienten hat hier womöglich einen größeren Einfluss auf die sympathische Nervenfaserdichte. Obwohl mittels der Dichte an BDNF-positiven Zellen kein ursächlicher Zusammenhang zu der beschriebenen Nervenfaserdissoziation hergestellt werden konnte, hat die Expression von BDNF im Synovialgewebe von Patienten mit RA und OA möglicherweise eine Rolle in den entzündlichen Prozessen. Die geringere Anzahl sensibler Nervenfasern bei Patienten mit OA kann durch BDNF nicht erklärt werden.

SP hat möglicherweise einen Einfluss auf die Pathogenese der OA. Die Verminderung der sensiblen Nervenfasern führt vielleicht zu wiederholten mechanischen Mikrotraumata (O'Connor et al., 1992). Weiterhin stimuliert SP die Produktion extrazellulären Matrix (Katayama et al. 1997). Der Verlust dieses wachstumsfördernden Effektes könnte dann womöglich zur Gewebestruktur führen. Ob BDNF für die Dissoziation der sympathischen vs. der sensiblen Nervenfasern verantwortlich ist, müssen Studien am Tiermodell zeigen.

Neuronale Veränderungen im Sehnengewebe von Patienten mit Achillodynie im Vergleich zu den Patienten mit Achillessehnenruptur zeigte eine deutliche Erhöhung der sensiblen Nervenfasern, während die Dichte an sympathischen Nervenfasern nicht unterschiedlich war. Im Vergleich zur Nervenfaserdichte im gesunden Synovialgewebe war die Dichte an sympathischen und sensiblen Nervenfasern bei beiden Patientengruppen deutlich niedriger.

Die SP-positiven Nervenfasern waren im Granulationsgewebe oft mit Blutgefäßen assoziiert. Diese Beobachtung bestätigt frühere Studien an Patienten mit Achillodynie, bei denen eine Neovaskularisierung und eine erhöhte allgemeine Nervenfaserdichte gefunden wurde (Alfredson et al., 2003; Shalabi et al., 2002). Die Bildung des Granulationsgewebes ist möglicherweise auf Mikrotraumata zurückzuführen, wofür die Anwesenheit der Hämosiderophagen spricht. Wie in Wundheilungsprozessen in Tiermodellen (Ackermann et al., 2003; Lai et al., 2002), findet auch im Granulationsgewebe von Achillody-

niepatienten eine Einwanderung sensibler Nervenfasern statt. Obwohl auch bei Ratten mit Achillessehnenruptur eine Einwanderung SP positiver Nervenfasern gezeigt werden konnte (Ackermann et al., 2003), war dies in dieser Studie bei den Rupturpatienten nicht der Fall. Im Rattenmodell stieg die Anzahl an sensiblen Nervenfasern ab der ersten Woche bis zur vierten Wochen an; danach nahm die Dichte wieder ab. Die Dichte an SP⁺ Nervenfasern korrelierte dabei mit der Schmerzempfindlichkeit (Ackermann et al., 2003). Da bei den Patienten mit Sehnenruptur die Proben für die Histologie kurz nach dem Trauma entnommen wurden, war der Zeitraum für das Einwandern von SP⁺ Nervenfasern zu kurz.

Vermutlich sind bei der Achillodynie viele Mikrotraumata ursächlich für die Entstehung der chronischen Erkrankung und das Verbleiben des Granulationsgewebes. Somit sind auch die SP⁺ Nervenfasern, die für die anhaltenden Schmerzen verantwortlich sind, im Granulationsgewebe vorhanden. Da SP die Proliferation von Fibroblasten induziert (Katayama und Nishioka, 1997), trägt dieses Neuropeptid möglicherweise auch zur Verdickung der Achillessehne bei.

Morbus Dupuytren ist eine proliferative Erkrankung des Fasziengewebes der Hand, die mit einer erhöhten Anzahl an Entzündungszellen und einer vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine einhergeht (Baird et al., 1993b; Gudmundsson et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde die Infiltration an Mastzellen im Fasziengewebe dieser Patienten untersucht, da bekannt ist, dass diese Entzündungszellen verschiedene fibrogene Mediatoren wie TGF- β (*transforming growth factor- β*) und FGF (*fibroblast growth factor*) sezernieren (Li und Baek, 2002). Auch sollte der Zusammenhang zwischen Mastzellen und der Dichte an sympathischen und sensiblen Nervenfasern dargestellt werden. Neuronale Veränderungen zeigten eine signifikante Erhöhung sensibler Nervenfasern bei Patienten mit Morbus Dupuytren im Vergleich zu nicht entzündetem Fasziengewebe, die positiv mit der Infiltration an Mastzellen korrelierte. Dieser Befund unterstützt die These, dass es sich bei dieser Erkrankung um einen entzündlichen Prozess handelt. Sowohl die Mastzellen als auch SP könnten zu einer vermehrten Zytokinproduktion und zu einer gesteigerten Fibroblastenproliferation führen. Ein ähnlicher Zusam-

menhang ist auch bei einer anderen Erkrankung – der Interstitiellen Zystitis – beschrieben worden. Sie ist charakterisiert durch eine fibrotische Veränderung der Blasenwand, die mit einer Infiltration von Mastzellen und dem Einwandern sensibler Nervenfasern verbunden ist (Selo-Ojeme und Onwunde, 2004). Das vermehrte Vorhandensein sensibler Nervenfasern zusammen mit der Infiltration an Mastzellen könnte also eine Erklärung für die vermehrte Fibroblastenproliferation im Faszien­gewebe von Patienten mit Morbus Dupuytren sein.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, sowohl hormonale als auch neuronale Veränderungen bei der RA aber auch bei anderen chronischen Erkrankungen des Bindegewebes herauszustellen, die möglicherweise zur Pathogenese der Krankheiten beitragen.

Um die hormonalen Veränderungen bei Patienten mit RA und OA zu untersuchen, wurden Konversionsexperimente an gemischten primären Synovialzellen durchgeführt um damit die lokale Umwandlung von Steroidhormonen im Gewebe durch die 11 β HSD und die STS aufzuzeigen. Weiterhin sollte die Bedeutung unterschiedlich hydroxylierter Östrogene bei der RA und dem SLE aufgezeigt werden. Hinsichtlich der neuronalen Veränderungen war die Innervierung im Synovialgewebe von Patienten mit OA, RA und gesunden Kontrollpersonen und die Rolle des BDNF von Interesse. Bei zwei weiteren Erkrankungen des Bindegewebes sollten ebenfalls die sympathische und sensible Nervenfaserdichte bestimmt werden: bei Achillodynie- und Dupuytren-Patienten. Die Dichte beider Nervenfasertypen sowie der Anzahl an BDNF⁺ Zellen wurde immunhistologisch bestimmt.

Die Untersuchung der Steroidkonversion durch die 11 β HSD zeigten eine reduzierte Kapazität der lokalen Reaktivierung von Kortison zu Kortisol in synovialen Zellen von RA-Patienten, was möglicherweise im Verlust an sympathischen Neurotransmittern seine Ursache hat. Synoviozyten von RA-Patienten konvertierten signifikant weniger DHEAS zu DHEA. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass diese Umwandlung durch die STS durch TNF inhibiert wird. Die Untersuchungen der verschiedenen hydroxylierten Östrogene bei Patienten mit RA und SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zeigten deutlich eine vermehrte Ausscheidung des 16 α -Hydroxyöstrons in Relation zu den 2 α -hydroxylierten Östrogenen. Insgesamt verdeutlichen diese Daten, dass bei Patienten mit RA weniger antiinflammatorische Hormone wie Kortisol und DHEA produziert werden und die Konzentration mitogener Östrogene im Vergleich zu anti-Östrogenen im Urin erhöht ist.

Die Dichte an sensiblen vs. sympathischen Nervenfasern zeigte eine positive Korrelation bei gesunden Kontrollpersonen und OA-Patienten, während die-

ser Zusammenhang bei den RA-Patienten negativ war. Die Rolle des BDNF konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Möglicherweise hat er eine stimulatorische Rolle auf die sympathischen vs. der sensiblen Nervenfasern bei gesunden Kontrollpersonen und OA-Patienten, was bei RA-Patienten nicht zu beobachten war. Bei Patienten mit Achillodynie und Morbus Dupuytren stellte sich die Bedeutung der sensiblen Nervenfasern in der Pathogenese dieser Erkrankungen heraus. Bei beiden Patientengruppen wrden im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen eine erhöhte Dichte an sensiblen Nervenfasern festgestellt. Bei den Patienten mit Achillodynie ist diese Beobachtung möglicherweise auf wiederholte Mikrotraumata zurückzuführen, die mit dem Einwandern sensibler Nervenfasern verbunden ist und zu den Schmerzen führt. Bei beiden Erkrankungen könnte SP zu einer vermehrten Fibroblastenproliferation führen. Beim Morbus Dupuytren spielt zusätzlich die Infiltration mit Mastzellen im Faszienngewebe der Hand eine Rolle in der Pathogenese.

6 Literaturverzeichnis

- Ackermann PW, Li J, Lundberg T, Kreicbergs A: Neuronal plasticity in relation to nociception and healing of rat Achilles tendon. *J Orthop Res.* 2003; 21:432-441.
- Ahmed M, Bjurholm A, schultzberg M, Theodorsson E, Kreicbergs A: Increased levels of substance P and calcitonin gene-related peptide in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995; 38:699-709.
- Alfredson H, Öhberg L, Forsgren S: Is vasculo-neural ingrowth the cause of pain in chronic Achilles tendinosis? An investigation using ultrasonography and colour doppler, immunohistochemistry and diagnostic injections. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2003; 11:334-338.
- Al-Matar MJ, Petty RE, Tucker LB, Malleson PN, Schroeder ML, Cabral DA: The early pattern of joint involvement predicts disease progression in children with oligoarticular (pauciarticular) juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:2708-2715.
- Aloe L, Tuveri MA, Carcassi U, Levi-Montalcini R: Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992; 35:351-355.
- Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Lundberg T, Theodorsson E: Co-variation of neuropeptide Y calcitonin gene-related peptide, substance P and neurokinin A in joint fluid from patients with temporomandibular joint arthritis. *Arch Oral Biol.* 1995; 40:127-135.
- Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA: Substance P selectively activates TNF- α gene expression in murine mast cells. *J Immunol.* 1993; 150:4478-4485.
- Aranda A, Pascual A: Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 2001; 81:1269-1304.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31:315-24.

- Aron DC, Findling JW, Tyrell JB: Glucocorticoids and adrenal androgens. In: Greenspan FS, Gardner DG: Basic & clinical endocrinology. 7. Aufl. The McGraw-Hill Companies. 2004; 362-413.
- Ashwell JD, Lu FWM, Vacchio MS: Glucocorticoids in T-cell development and function. *Annu Rev Immunol*. 2000 ; 18:309-345.
- Baerwald CGO, Laufenberg M, Specht T, von Wichert P, Burmester GR, Krause A: Impaired sympathetic influence on the immune response in patients with rheumatoid arthritis due to lymphocyte subset-specific modulation of β_2 -adrenergic receptors. *Br J Rheumatol*. 1997; 36:1262-1269.
- Baird KS, Alwan WH, Crossan JF, Wojciak B: T-cell mediated response in Dupuytren's disease. *Lancet*. 1993a; 341:1622-1623.
- Baird KS, Crossan JF, Ralston SH: Abnormal growth factor and cytokine expression in Dupuytren's contracture. *J Clin Pathol*. 1993b; 46:425-428.
- Barouch R, Appel E, Kazimirsky G, Braun A, Renz H, Brodie C: Differential regulation of neurotrophin expression by mitogens and neurotransmitters in mouse lymphocytes. *J Neuroimmunol*. 2000; 103:112-121.
- Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schluchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienenert M, Radbruch A, Burmester G-R, Lauster R, Scheffold A, Buttgerit F: Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J*. 2004; 18:70-80.
- Bayas A, Hummel V, Kallmann BA, Karch C, Toyka KV, Rieckmann P: Human cerebral endothelial cells are a potential source for bioactive BDNF. *Cytokine*. 2002; 19:55-58.
- Bedoui S, Kawamura N, Straub RH, Pabst R, Yamamura T, von Hörsten S: Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. *J Neuroimmunol*. 2003; 134:1-11.
- Bélanger A, Candas B, Dupont A, Cusan L, Diamond P, Gomez JL, Labrie F: Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year old men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 79:1086-1090.

- Bijlsma JWJ, Huber-Bruning O, Thijssen JHH: Effect of oestrogen treatment on clinical and laboratory manifestations of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1987; 46:777-779.
- Booij A, Biewenga-Booij, Huber-Bruning O, Cornelis C, Jacobs JWJ, Bijlsma JWJ: Androgens as adjuvant treatment in postmenopausal female patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1996; 55:811-815.
- Braun A, Lommatzsch M, Lewin GR, Virchow JC, Renz H: Neurotrophins: a link between airway inflammation and airway smooth muscle contractility in asthma? *Int Arch Allergy Immunol*. 1999; 118:163-165.
- Braun J, Brandt J, Listing J, Zink A, Alten R, Golder W, Gromnica-Ihle E, Kellner H, Krause A, Schneider M, Sörensen H, Zeidler H, Thriene W, Sieper J: Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet*. 2002; 359:1187-1193.
- Braunstein GD: Testes. In: Greenspan FS, Gardner DG: Basic & clinical endocrinology. 7. Aufl. The McGraw-Hill Companies. 2004; 478-510.
- Brennan P, Silman A: Breast-feeding and the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1994; 37:808-816. Dupuytren's disease in the northern part of germany. Epidemiological features of more than 500 cases. *Unfallchirurg*. 2001; 104:303-311.
- Brickley-Parsons D, Glimcher MJ, Smith RJ, Albin R, Adams J: Biochemical changes in the collagen of the palmar fascia in patients with dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg Am*. 1981; 63:787-797.
- Bucala R, Lahit RG, Fishman J, Cerami A: Increased levels of 16 α -hydroxyestrone-modified proteins in pregnancy and in systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985; 60:841-847.
- Cai T-Q, Wong B, Mundt SS, Thieringer R, Wright SD, Hermanowski-Vosatka A: Induction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 but not -2 in human aortic smooth muscle cells by inflammatory stimuli. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001; 77:117-122.
- Carlsten H, Holmdahl R, Tarkowski A, Nilsson L-A: Oestradiol- and testosterone-mediated effects on the immune system in normal and autoimmune mice are genetically linked and inherited as dominant traits. *Immunology*. 1989; 68:209-214.

- Carty SM, Snowden N, Silman AJ: Should infection still be considered as the most triggering factor for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2003; 30:425-429.
- Castagnetta LA, Carrub G, Granata OM; Stefano R, Miele M, Schmidt M, Cutolo M, Straub RH: Increased estrogen formation and estrogen to androgen ration in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2003; 30:2597-2605.
- Chikanza IC, Petrou P, Kingsley G, Chrousos G, Panayi GS: Defective hypothalamic response to immune and inflammatory stimuli in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992; 35:1281-1288.
- Cho H-J, Kim J-K, Zhou X-F, Rush RA: Increased brain derived neurotrophic factor immunoreactivity in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation. *Brain Res.* 1997; 764:269-272.
- Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, Walker EA, Bland R, Sheppard MC, Hewison M, Stewart PM: Modulation of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase isoenzymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoids inactivation to activation. *J Bone Miner Res.* 2001; 16:1037-1044.
- Correale J, Arias M, Gilmore W: Steroid hormone regulation of cyteokine secretion by proteolipid protein-specific $CD4^+$ T-cells clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol.* 1998; 161:3365-3374.
- Crofford L, Kalogeras KT, Mastorakos G, Magiakou MA, Wells J, Kanik KS, Gold PW, Chrousos GP, Wilder RL: Circadian relationships between interleukin (IL)-6 and hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones: failure of IL-6 to cause sustained hypercortisolism in patients with early untreated rheumatoid arthritis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:1279-1283.
- Cronstein BN, Naime D, Firestein G: The antiinflammatory effects of an adenosine kinase inhibitor are mediated by adenosine. *Arthritis Rheum.* 1995; 38:1040-1045.
- Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Barone A, Sulli A, Coviello DA, Carabbio C, Felli L, Miceli D, Farruggio R, Carruba G, Castagnetta L: Androgen

- and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81:820-827.
- Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Clerico P, Indiveri F, Carruba G, Fecarotta E, Castagnetta L: Evidence for the presence of androgen receptors in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Arthritis Rheum.* 1992; 35:1007-1015.
- Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Intra E, Accardo S: Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1991; 34:1-5.
- Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Monachesi M, Accardo S: Sex hormone status of male patients with rheumatoid arthritis: evidence of low serum concentrations of testosterone at baseline and after human chorionic gonadotropin stimulation. *Arthritis Rheum.* 1988; 31:1341-1317.
- Cutolo M, Foppiani L, Prete C, Ballarino P, Sulli A, Villaggio B, Serio B, Giusti M, Accardo S: Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis function in premenopausal women with rheumatoid arthritis not treated with glucocorticoids. *J Rheumatol.* 1999; 26:282-288.
- Cutolo M, Serio B, Craviotto C, Pizzorni C, Sulli A: Circadian rhythms in RA. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62:593-596.
- Cutolo M, Villaggio B, Accardo S, Balleari E, Cannella S, Ferruggio R, Castagnetta L: Cultured macrophage-like synoviocytes from rheumatoid arthritis synovium metabolize testosterone and exhibit inhibition of IL-1 β production. *Arthritis Rheum.* 1993; 36(suppl.):S158.
- Deighton CM, Watson MJ, Walker DJ: sex hormones in postmenopausal HLA-identical rheumatoid arthritis discordant sibling pairs. *J Rheumatol.* 1992; 19:1663-1667.
- Dekkers JC, Geenen R, Godaert GLR, Glaudemans KAFM, Lefeber FPJG, van Doornen LJP, Bijlsma JWJ: Experimentally challenged reactivity of the hypothalamic pituitary adrenal axis in patients with recently diagnosed rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2001; 28:1496-1504.
- Dessein PH, Joffe BI, Stanwix AE, Moomal Z: Hyposecretion of the adrenal androgen dehydroepiandrosterone sulfate and its relation to clinical variables in inflammatory arthritis. *Arthritis Res.* 2001; 3:183-188.

- DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Antakly T, Tardif G, Cloutier JM, Pelletier JP: Reduced expression of glucocorticoid receptor levels in human osteoarthritis chondrocytes. Role in the suppression of metalloprotease synthesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76:1128-1134.
- DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Cloutier J-M, Pelletier J-P: Modulation of glucocorticoid receptor expression in human articular chondrocytes by camp and prostaglandins. *J Rheumatol.* 1991a; 18(suppl. 27):102-105.
- DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Wosu LO, Sandor T, Antakly T, Pelletier JP: Glucocorticoid receptor mediated inhibition of interleukin-1 stimulated neutral metalloprotease synthesis in normal human chondrocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991b; 72:316-326.
- DiBattista JA, Zhang M, Martel-Pelletier J, Fernandes J, Alaaeddine N, Pelletier JP: Enhancement of phosphorylation and transcriptional activity of the glucocorticoids receptor in human synovial fibroblasts by nimesulide, a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor. *Arthritis Rheum.* 1999; 42:157-166.
- Dolan AL: Asymmetric rheumatoid vasculitis in a hemiplegic patient. *Ann Rheum Dis.* 1995; 54:532.
- Dong Y, Aronsson M, Gustafsson J-Å, Okret S: The mechanism of cAMP-induced glucocorticoid receptor expression. *J Biol Chem.* 1989; 264:13679-13683.
- Doran MF, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE: The effect of oral contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study. *J Rheumatol.* 2004; 31:207-213.
- Doran MF, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE: The effect of oral contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study. *J Rheumatol.* 2004; 31:207-13.
- Drossaers.Bakker KW, Zwinderman AH, van Zeben D, Breedveld FC, Hazes JMW: Pregnancy and oral contraceptive use do not significantly influence outcome in long term rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61:405-408.
- Dulos GJ, Bagchus WM: Androgens indirectly accelerate thymocyte apoptosis. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1:321-328.

- Edwards CRW, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl JR: 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in determining tissue-specific glucocorticoid effects. *Steroids*. 1996; 61:263-269.
- Eggert M, Kluter A, Rusch D, Schmidt KL, Dotzlaw H, Schulz M, Pabst W, Boke J, Renkawitz R, Neek G: Expression analysis of the glucocorticoid receptor and the nuclear factor- κ B subunit p50 in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002; 29:2500-2506.
- Eickelberg O, Roth M, Lörx R, Bruce V, Rüdiger J, Johnson M, Block L-H: Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by β_2 -adrenergic receptor agonists in primary human lung fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1999; 274:1005-1010.
- Eijsbouts A, van den Hoogen F, Laan R, de Waal Malefijt M, Hermus A, Sweep C, de Rooij DJ, van de Putte L: Similar response of adrenocorticotrophic hormone, cortisol and prolactin to surgery in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol*. 1998; 37:1138-1139.
- Elliot MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, Brennan FM, Walker J, Bijl H, Ghrayeb J, Woody JN: Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor α . *Arthritis Rheum*. 1993; 36:1681-1690.
- Escher G, Galli I, Vishwanath BS, Frey BM, Frey BJ: Tumor necrosis factor α and interleukin 1 β enhance the cortisone/cortisol shuttle. *J Exp Med*. 1997; 186:189-198.
- Evans MJ, MacLaughlin S, Marvin RD, Abdou NI: Estrogen decreases *in vitro* apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from women with normal menstrual cycles and decreases TNF- α production in SLE but not in normal cultures. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997; 82:258-262.
- Ferguson SE, Pallikaros Z, Michael AE, Cooke BA: The effects of different culture media, glucose, pyridine nucleotides and adenosine on the activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1999; 158:37-44.

- Fishman J, Martucci C: Biological properties of 16 α -hydroxyestrone: implications in estrogen physiology and pathophysiology. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980; 51:611-615.
- Flint MH, Gillard GC, Reilly HC: The glucosaminglykane of Dupuytren's disease. *Conn Tiss Res.* 1982; 9:173-179.
- Flügge G: Effects of cortisol on brain α_2 -adrenoreceptors: potential role in stress. *Neurosci Biobehav Rev.* 1999; 23:949-956.
- Giltay EJ, Verhoeven AC, van Schaardenburg D, Popp-Snijders C, Boers LJJ, Dijkmans BAC: Serum dehydroepiandrosterone sulfate levels in patients with early rheumatoid arthritis: positive association with C-reactive protein, but not with HLA-DR Genotype. *Br J Rheumatol.* 1998; 37:1254-1256.
- Gordon G, Beastall GH, Thomson JA, Sturrock RD: Prolonged hypogonadism in male patients with rheumatoid arthritis during flares in disease activity. *Br J Rheumatol.* 1988; 27:440-444.
- Greenspan FS, Gardner DG: Basic & clinical endocrinology. 7. Aufl. The McGraw-Hill Companies. 2004.
- Gruol DJ, Campbell NF, Bourgeois S: Cyclic AMP-dependent protein kinase promotes glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem.* 1986; 261:4909-4914.
- Gudmundsson KG, Arngrimsson R, Arinbjarnarson S, Olafsson A, Jonsson T: T- and B-lymphocyte subsets in patients with Dupuytren's disease. Correlations with disease severity. *J Hand Surg.* 1998; 23:724-727.
- Guirao X, Kumar A, Katz J, Smith M, Lin E, Keogh C, Calvano SE, Lowry SF: Catecholamines increase monocyte TNF-receptors and inhibit TNF through β_2 -adrenoreceptor activation. *Am J Physiol.* 1997; 273:1203-1208.
- Gutiérrez MA, García ME, Rodríguez JA, Mardonez G, Jacobelli S, Rivero S : Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with active rheumatoid arthritis : a controlled study using insulin hypoglycemia stress test and prolactin stimulation. *J Rheumatol.* 1999; 26:277-81.
- Hall GM, Daniels M, Huskisson EC, Spector TD: A randomised controlled trial of the effect of hormone replacement therapy on disease activity

- in postmenopausal rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1994; 53:112-116.
- Hall GM, Perry LA, Spector TD: Depressed levels of dehydroepiandrosterone sulfate in postmenopausal women with rheumatoid arthritis but no relation with axial bone density. *Ann Rheum Dis*. 1993; 52:211-214.
- Hammami MM, Siiteri PK: Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human skin Fibroblasts: enzymatic modulation of glucocorticoid action. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991; 73:326-334.
- Handoko K, Yang K, Strutt B, Khadil W, Killinger D: Insulin attenuates the stimulatory effects of tumor necrosis factor α on 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in human adipose stromal cells. *J Steroid Biochem Molec Biol*. 2000; 72:163-168.
- Harbuz MS, Jessop DS: Is there a defect in cortisol production in rheumatoid arthritis? *Rheumatology*. 1999; 38:298-302.
- Harbuz MS, Korendowych E, Jessop DS, Crown AL, Lightman SL, Kirwan JR: Hypothalamo-pituitary-adrenal axis dysregulation in patients with rheumatoid arthritis after the dexamethasone/corticotropin releasing factor test. *J Endocrinology*. 2003; 178:55-60.
- Harbuz MS, Perveen-Gill Z, Lightman SL, Jessop DS: A protective role for testosterone in adjuvant-induced arthritis. *Br J Rheumatol*. 1995; 34:1117-1122.
- Härle P, Möbius D, Carr DJJ, Schölmerich J, Straub RH: The sympathetic nervous system confers an opposing time-dependent immune modulating effect by altering the cytokine profile in local lymph nodes and spleen in CIA arthritis. *Arthritis Rheum*. Zur Publikation angenommen.
- Harney S, Wordsworth BP: Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 2002; 60:465-473.
- Hartkamp A, Geenen R, Godaert GLR, Bijl M, Bijlsma JWW, Derksen RHW: The effect of dehydroepiandrosterone on lumbar spine bone mineral density in patients with quiescent systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004; 50:3591-3595.

- Haskó G, Németh ZH, Szabó C, Zsilla G, Salzman AL, Vizi ES: Isoproterenol inhibits IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Brain Res Bull.* 1998; 45:183-187.
- Hennebold JD, Daynes RA: Inhibition of skin 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in vivo potentiates the anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Arch Dermatol Res.* 1998; 290:413-419.
- Hennebold JD, Daynes RA: Regulation of macrophage dehydroepiandrosterone sulfate metabolism by inflammatory cytokines. *Endocrinology.* 1994; 135:67-75.
- Hennebold JD, Mu H-H, Poynter ME, Chen X-P, Daynes RA: Active catabolism of glucocorticoids by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase *in vivo* is a necessary requirement for natural resistance to infection with listeria monocytogenes. *Int Immunology.* 1997; 9:105-115.
- Hennebold JD, Ryu SY, Mu HH, Galbraith A, Daynes RA: 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase modulation of glucocorticoids activities in lymphoid organs. *Am J Physiol.* 1996; 260:1296-1306.
- Heppelmann B, Pawlak M: Sensitisation of articular afferents in normal and inflamed knee joints by substance P in the rat. *Neurosci Lett.* 1993; 223:97-100.
- Hernandez-Guzman FG, Higashiyama T, Osawa Y, Ghosh D: Purification, characterisation and crystallization of human placental estrone/dehydroepiandrosterone sulfatase, a membrane-bound enzyme of the endoplasmatic reticulum. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001; 78:441-450.
- Hirano D, Nagashima M, Ogawa R, Yoshino S: Serum levels of interleukin 6 and stress related substances indicate mental stress condition in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2001; 28:490-495.
- Imai S, Tokunaga Y, Kontinen YT, Maeda T, Hukuda S, Santavirta S: Ultrastructure of the synovial sensory peptidergic fibers is distinctively altered in different phases of adjuvant induced arthritis in rats: ultra-morphological characterisation combined with morphometric and immunohistochemical study for substance P, calcitonin gene related peptide, and protein gene product 9.5. *J Rheumatol.* 1997; 24:2177-2187.

- Ishizuka M, Hatori M, Suzuki T, Miki Y, Darnel AD, Tazawa C, Sawai T, Uzuki M, Tanaka Y, Kokubun S, Sasano H: Sex steroid receptors in rheumatoid arthritis. *Clinical Science*. 2004; 106:293-300.
- Iwasaki Y, Asai M, Yoshida M, Nigawara T, Kambayashi M, Nakashima N: Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits nuclear factor- κ B-dependent transcription in hepatocytes, possibly through antioxidant effect. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:3449-3454.
- Jäättelä M, Ilvesmäki V, Voutilainen R, Stenman U-H, Saksela E: Tumor necrosis factor as apotent inhibitor of Adrenocorticotropin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology*. 1991; 128:623-629.
- Johnson KW, Davis BH, Smith KA: camp antagonizes interleukin 2-promoted T-cell cycle progression at a discrete point in early G₁. *Proc Natl Acad Sci*. 1988; 85:6072-6076.
- Jorgensen C, Picot MC, Bologna C, Sany J: Oral contraception, parity, breast feeding, and severity of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1996; 55:94-98.
- Josipovic B, Josipovic A: Basal levels of DHEAS as a marker for disease activity in premenopausal women with recent onset rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002; 29:1803-1805.
- Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K: Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and Immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1999; 42:328-337.
- Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K: Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*. 106:410-415.
- Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K: Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997; 40:1703-1711.
- Kanik KS, Chrousos GP, Schumacher HR, Crane ML, Yarboro CH, Wilder RL: Adrenocorticotropin, glucocorticoids, and androgen secretion in

- patients with new onset synovitis/rheumatoid arthritis: relations with indices of inflammation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:1461-1466.
- Katayama I, Nishioka K: Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation: possible involvement of neuropeptide in tissue fibrosis. *J Dermatol Sci.* 1997; 15:201-206.
- Keller ET, Chang C, Ershler WB: Inhibition of NF κ B activity through maintenance of I κ B α levels contributes to dihydrotestosterone-mediated repression of the interleukin-6 promoter. *J Biol Chem.* 1996; 271:26267-26275.
- Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WEF, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle R-L, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R: Activated human T cells, B cells and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med.* 1999; 189:865-870.
- Khalkhali-Ellis Z, Seftor EA, Nieva DRC, Handa RJ, Price jr. RH, Kirschmann A, Baragi VM, Sharma RV, Bhalla RC, Moore TL, Hendrix MJC: Estrogen and progesterone regulation of human fibroblast-like synoviocytes function *in vitro*: implications in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2000; 27:1622-1631.
- Kidd BL, Cruwys SC, Garrett NE, Mapp PI, Jolliffe VA, Blake DR: Neurogenic influences on contralateral responses during experimental rat monoarthritis. *Brain Res.* 1995; 688:72-76.
- Kimura M, Tanaka S-I, Yamada Y, Kiuchi Y, Yamakawa T, Sekihara H: Dehydroepiandrosterone decreases serum tumor necrosis factor- α and restores insulin sensitivity: Independent effect from secondary weight reduction in genetically obese Zucker fatty rats. *Endocrinology.* 1998; 139:3249-3253.
- Kirstein M, Fariñas I: Sensing life: regulation of sensory neuron survival by neurotrophins. *Cell Mol. Life.* 2002; 59:1787-1802.
- Kobayashi Y, Tagawa N, Muraoka K, Okamoto Y, Nishida M: Participation of endogenous dehydroepiandrosterone and its sulfate in the pathology

- of collagen-induced arthritis in mice. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26:1596-1599.
- Konttinen YT, Kemppinen P, Segerberg M, Hukkanen M, Rees R, Santavirta S, Sorsa T, Pertovaara A, Polak JM: Peripheral and spinal neural mechanisms in arthritis, with particular reference to treatment of inflammation and pain. *Arthritis Rheum.* 1994; 37:965-982.
- Korn SH, Wouters EFM, Wesseling G, Arends J-W, Thunnissen FBJM: Interaction between Glucocorticoids and β 2-agonists: α and β glucocorticoid-receptor mRNA expression in human bronchial epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56:1561-1569.
- Labrie C, Bélanger A, Labrie F: Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstendione in the rat ventral prostate. *Endocrinology.* 1988; 123:1412-1417.
- Labrie F, Bélanger A, Cusan L, Candas C: Physiological changes in Dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: intracrinology. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1997; 82:2403-2409.
- Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J: DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: Intracrinology. *Fron Neuroendocrin.* 2001; 22:185-212.
- Lahita RG, Bradlow HL, Ginzler E, Pang S, New M: Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1987; 30:241-248.
- Lai X, Wang Z, Wei L, Wang L: Effect of substance P released from peripheral nerve ending on endogenous expression of epidermal growth factor and its receptor in wound healing. *Chin J Traumatol.* 2002; 5:176-179.
- Lam FY, Ferrell WR: Inhibition of carrageenan induced inflammation in the rat knee joint by substance P antagonist. *Ann Rheum Dis.* 1989; 48:928-932.
- Lapadula G, Iannone F, Zuccaro C, Covelli M, Grattagliano V, Pipitone V: Recovery of erosive rheumatoid arthritis after human immunodeficiency virus-1 infection and hemiplegia. *J Rheumatol.* 1997; 24:747-751.

- Le Moine O, Stordeur P, Schandené L, Marchant A, de Goote D, Goldman M, Devière J: Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J Immunol.* 1996 ; 156 :4408-4414.
- Lee Nelson J, Hughes KA, Smith AG, Nisperos BB, Branchaud AM, Hansen JA: Maternal-fetal disparity in HLA class II alloantigens and the pregnancy-induced amelioration of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 1993; 329:466-471.
- Lee SY, Kim MK, Shin C, Shim JJ, Kim HK, Kang KH, Yoo SH, In KH: Substance P-immunoreactive nerves in endobronchial biopsies in cough-variant asthma and classic asthma. *Respiration.* 2003; 70:49-53.
- Levine JD, Coderre TJ Helms C, Basbaum AI : β_2 Adrenergic mechanisms in experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci.* 1988; 85:4553-4556.
- Levine JD, Moskowitz MA, Basbaum AI: The contribution of neurogenic inflammation in experimental arthritis. *J Immunol.* 1985; 135:843-847.
- Li AKC, Koroly MJ, Schattenkerk ME, Malt RA, Young M: Nerve growth factor: acceleration of the rate of wound healing in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 77:4379-4381.
- Li CY, Baek JY: Mastocytosis and fibrosis: role of cytokines. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002; 127:123-126.
- Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, Crane ML, Chrousos GP, Wilder RL, Elenkov IJ: Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol.* 2000; 164:436-42.
- Lorton D, Lubahn L Klein N, Scheller J, Bellinger DC: Dual role for noradrenergic innervation of lymphoid tissue and arthritic joints in adjuvant-induced arthritis. *Brain Behav Immun.* 1999; 13:315-334.
- Malfait A-M, Malik AS, Marinova-Mutafchieva L, Butler DM, Maini RN, Feldmann M: The β_2 -adrenergic agonist salbutamol is a potent suppressor of established collagen-induced arthritis: mechanisms of action. *J Immunol.* 1999; 162:6278-6283.
- Masi AT, Aldag JC, Chatterton RT, Adams RF, Kitabchi AE: Adrenal androgen and glucocorticoids dissociation in premenopausal rheumatoid arthritis: a significant correlate or precursor to onset? *Z Rheumatol.* 2000; 59(suppl. 2):54-61.

- Mastorakos G, Ilias I: Relationship between interleukin-6 (IL-6) and hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones in rheumatoid arthritis. 2000; 59(suppl. 2):75-79.
- Mateo L, Nolla JM, Bonnin MR, Navarro MA, Roig-Escofet D: Sex hormone status and bone mineral density in men with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1995; 22:1455-1460.
- Matsuoka R, Yanaihara A, Saito H, Furusawa Y, Toma Y, Shimizu Y, Yanaihara T, Okai T: Regulation of estrogen activity in human endometrium: effect of IL-1 β on steroid sulfatase activity in human endometrial stromal cells. *Steroids*. 2002; 67:655-659.
- Matucci-Cerinic M, Giacomelli R, Pignone A, Cagnoni ML, Generini S, Casale R, Cipriani P, Del Rosso A, Tirassa P, Konttinen YT, Kahaleh BM, Fan P-S, Paoletti M, Marchesi C, Cagnoni C, Aloe L: Nerve growth factor and neuropeptides circulating levels in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2001; 60:487-494.
- Matucci-Cernic M, Konttinen Y, Generini S, Cutolo M: Neuropeptides and steroid hormones in arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 1998; 10:220-235.
- Mazzocchi G, Rossi GP, Nerli G, Malendowicz LK, Albertin G, Nussdorfer GG: 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase expression and activity in the human adrenal cortex. *FASEB J*. 1998; 12:1533-1539.
- McKay LI, Cidlowski JA: Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrine Rev*. 1999; 20:435-459.
- Miller LE, Grifka J, Schölmerich J, Straub RH: Norepinephrine from synovial tyrosine hydroxylase positive cells is a strong indicator of synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002; 29:427-735.
- Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH: The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J*. 2000; 14:2097-2107.
- Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Schölmerich J, Straub RH: Increased prevalence of semaphoring 3C, a repellent of

- sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:1156-1163.
- Mishima K, Otani H, Tanabe T, Kawasaki H, Oshiro A, Saito N, Ogawa R, Inagaki C: Molecular mechanisms for α_2 -adrenoreceptor-mediated regulation of synoviocytes populations. *Jpn J Pharmacol.* 2001; 85:214-226.
- Mohr W, Vossbeck G: Proliferation and ^3H -proline incorporation of cells of Duputren's fibromatosis. *Z Rheumatol.* 1985; 44:226-230.
- Mok CC, Lau CS: Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol.* 2003; 56:481-490.
- Montecucco CM, Caporali R, Caprotti P, Caprotti M, Notario A: Sex hormones and bone metabolism in postmenopausal rheumatoid arthritis treated with two different glucocorticoids. *J Rheumatol.* 1992; 19:1895-1900.
- Motulsky HJ, Insel PA: Adrenergic receptors in man: direct identification, physiologic regulation and clinical alterations. *N Engl J Med.* 1982; 307:18-29.
- Movin T, Gad A, Reinholt FP, Rolf C: Tendon pathology in long-standing achillodynia. Biopsy findings in 40 patients. *Acta Orthop Scand.* 1997; 68:170-175.
- Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S: Activation of synoviocytes. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12:186-94.
- Nakajin S, Hall PF: Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis. *J Biol Chem.* 1981; 256:3871-3876.
- Nakamura Y, Miki Y, Suzuki T, Nakata T, Darnel AD, Moriya T, Tazawa C, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H: Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in the atherosclerotic human aorta. *Am J Pathol.* 2003; 163:1329-1339.
- Nissalo S, Li T-F, Santavirta S, Takagi M, Hietanen J, Konttinen YT: Dense innervation in pseudocapsular tissue compared to aneural interface tissue in loose totally replaced hips. *J Rheumatol.* 2002; 29:796-803.
- O'Connor BL, Visco DM, Brandt KD, Myers SL, Kalasinski LA: Neurogenic acceleration of osteoarthritis. The effects of previous neurectomy of the articular nerves on the development of osteoarthritis after tran-

- section of the anterior cruciate ligament in dogs. *J Bone Joint Surg.* 1992 ; 74:367-376.
- Offner H, Zamora A, Subramanian S, Polanczyk M, Krogstad A, Auci DL, Morgan EE, Reading CL: Asynthetic androstene analogue inhibits collagen-induced arthritis in the mouse. *Clin Immunol.* 2004; 110:181-190.
- Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelmann JH: Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984; 59:551-555.
- Padgett DA, Loria RM: Endocrine regulation of murine macrophage function: effects of dehydroepiandrosterone, androstenediol, and androstenediol. *J Neuroimmunol.* 1998; 84:61-68.
- Pelletier JP, DiBattista JA, Zhang M, Fernandes J, Alaaeddine N, Martel-Pelletier J: Effect of nimesulide on glucocorticoid receptor activity in human synovial fibroblasts. *Rheumatology.* 1999; 38(suppl. 1):11-13.
- Pereira da Silva J, Carmo-Fonseca M: Peptide containing nerves in human synovium: immunohistochemical evidence for decreased innervation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1990; 17:1592-1599.
- Petrovsky N, McNair P, Harrison LC: Diurnal rhythms of proinflammatory cytokines: regulation by plasma cortisol and therapeutic implications. *Cytokine.* 1998; 10:307-312.
- Pezet S, Malcangio M, McMahon SB: BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? *Brain Res Rev.* 2002; 40:240-249.
- Pezzati P, Staniz AM, Marshall JS, Bienenstock J, Stead RH : Expression of nerve growth factor receptor immunoreactivity on follicular dendritic cells from human mucosa associated lymphoid tissues. *Immunology.* 1992; 76:485-490.
- Polan LM, Loukides J, Nelson P, Carding S, Diamond M, Walsh A, Bottomly K: Progesterone and estradiol modulate interleukin-1 β messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989; 89:1200-1206,
- Priebe T, Kandil O, Nakic M, Fang Pan B, Nelson JA: Selective modulation of antibody response and natural killer cell activity by purine nucleoside analogues. *Cancer Res.* 1988; 48:4799-4803.

- Quinkler M, Troeger H, Eigendorff E, Maser-Gluth C, Stiglic A, Oelkers W, Bähr V, Diedrich S: Enhanced 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in stress adaption in the guinea pig. *J Endocrinol.* 2003; 176:185-192.
- Qureshi FI, Hornigold R, Spencer JD, Hall SM: Langerhans cells in Dupuytren's contracture. *J Hand Surg.* 2001; 26:362-367.
- Rameshwar P, Gascon P, Ganea D: Stimulation of IL-2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. *J Immunol.* 1993; 151:2484-2496.
- Rameshwar P, Poddar A, Zhu G, Gascón P: Receptor induction regulates the synergistic effects of substance P with IL-1 and platelet-derived growth factor on the proliferation of bone marrow fibroblasts. *J Immunol.* 1997; 158:3417-3424.
- Renz H, Gong J-H, Schmidt A, Nain M, Gerns D: Release of tumor necrosis factor- α from macrophages: enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E₂ and cyclic nucleotides. *J Immunol.* 1988; 141:2388-2393.
- Ritchie PK, Spangelo BL, Krzymowski DK, Rossiter TB, Kurth E, Judd AM : Adenosine increases interleukin 6 release and decreases tumor necrosis factor release from rat adrenal zona glomerulosa cells, ovarian cells, anterior pituitary cells, and peritoneal macrophages. *Cytokine.* 1997; 9:187-198.
- Ritchlin CT: Mechanisms of erosion in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2004; 31:1229-1237.
- Robinson B, Cutolo M: Should dehydroepiandrosterone replacement be provided with glucocorticoids? *Rheumatology.* 1999; 38:488-495.
- Rolf C, Movin T: Etiology, histopathology, and outcome of surgery in achillobodynia. *Foot Ankle Int.* 1997; 18:565-569.
- Rosen M, Cedars MI: Female reproductive endocrinology & infertility. In: Greenspan FS, Gardner DG: Basic & clinical endocrinology. 7. Aufl. The McGraw-Hill Companies. 2004; 511-607.
- Rötzsch A, Thoss K, Petrow PK, Henzgen S, Bräuer R: Amelioration of murine antigen-induced arthritis by dehydroepiandrosterone (DHEA). *Inflamm Res.* 2004; 53:189-198.

- Rovensky J, Imrich R, Koska J, Kovalancik M, Killinger Z, Payer J, Vigas M, Jezova D: Cortisol elimination from plasma in premenopausal women with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62:674-676.
- Sambrook P, Birmingham J, Champion D, Kelly P, Kempler S, Freund J, Eisman J: Postmenopausal bone loss in rheumatoid arthritis: effect of estrogens and androgens. *J Rheumatol*. 1992; 19:357-361.
- Sambrook PN, Eisman JA, Champion GD, Pocock NA: Sex hormone status and osteoporosis in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988; 31:973-978.
- Sampath-Kumar R, Yu M, Khalil MW, Yang K: Metyrapone is a competitive inhibitor of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 reductase. *J Steroid Biochem Molec Biol*. 1997; 62:195-199.
- Sanders VM, Baker RA, Ramer-Quinn DS, Kasproicz DJ, Fuchs BA, Street NE: Differential expression of the β_2 -adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones. *J Immunol*. 1997; 158:4200-4210.
- Sangha O: Epidemiology of rheumatic diseases. *Rheumatology*. 2000; 39(suppl. 2):3-12.
- Schlaghecke R, Kornely E, Wollenhaupt J, Specker C: Glucocorticoid receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1992; 35:740-744.
- Schmidt M, Kreutz M, Löffler G, Schölmerich J, Straub RH: Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *J Endocrinol*. 2000; 164:161-169.
- Schmidt M, Weidler C, Naumann H, Anders S, Schölmerich J, Straub RH: Androgen conversion in OA and RA synoviocytes – androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5 α -reduced androgens. *Arthritis Rheum*, in Revision.
- Schmidt P, Holsboer F, Spengler D: β_2 -Adrenergic receptors potentiate glucocorticoid receptor transactivation via G protein $\beta\gamma$ -subunits and the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Mol Endocrinol*. 2001; 15:553-564.
- Schneider J, Huh MM, Bradlow L, Fishman J: Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 1984; 259:4840-4845.

- Schubert D, LaCorbiere M, Klier FG, Steinbach JH: The modulation of neurotransmitter synthesis by steroid hormones and insulin. *Brain Res.* 1980; 190:67-79.
- Seckl JR, Walker BR: Minireview: 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 – a tissue-specific amplifier of glucocorticoids action. *Endocrinology.* 2001; 142:1371-1376.
- Selo-Ojeme DO, Onwunde JL: Interstitial cystitis. *J Obstet Gynaecol.* 2004; 24:216-225.
- Serra MC, Bazzoni F, della Bianca V, Greskowiak M, Rossi F: Activation of human neutrophils by substance P: effect on oxidative metabolism, exocytosis, cytosolic Ca²⁺ concentration and inositol phosphate formation. *J Immunol.* 1988; 141:2118-2124.
- Serra MC, Calzetti F, Ceska M, Cassatella MA: Effect of substance P on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology.* 1994; 82:63-69.
- Shalabi A, Kristoffersen-Wiberg M, Papadogiannakis N, Aspelin P, Movin T: Dynamic contrast-enhanced MR imaging and histopathology in chronic Achilles tendinosis. A longitudinal MR study of 15 patients. *Acta Radiol.* 2002; 43:198-206.
- Shu X-Q, Mendell LM: Neurotrophins and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96:7693-7696.
- Silman AJ, Kay A, Brennan P: Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992; 35:152-155.
- Silman AJ, Pearson, JE: Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002; 4(suppl. 3):265-272.
- Sluka KA, Lawand NB, Westlund KN: Joint inflammation is reduced by dorsal rhizotomy and not by sympathectomy or spinal cord transection. *Ann Rheum Dis.* 1994; 53:309-314.
- Spector TD, Roman E, Silman AJ: The pill, parity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1990; 33:782-789.
- Speirs V, Walton DS, Hall M-C, Atkin SL: In vivo and in vitro expression of steroid-converting enzymes in human breast tumors: associations with interleukin-6. *Br J Cancer.* 1999; 81:690-695.

- Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL: Stimulation of α -adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1990; 145:1430-1434.
- Steckelbroeck S, Nassen A, Ugele B, Ludwig M, Watzka M, Reissinger A, Clusmann H, Lütjohann D, Siekmann L, Klingmüller D, Hans VH: Steroid sulfatase (STS) expression in the human temporal lobe: enzyme activity, mRNA expression and immunohistochemistry study. *J Neurochem.* 2004; 89:403-417.
- Steer JH, Ma DTS, Dusci L, Garas G, Pedersen KE, Joyce DA: Altered leucocyte trafficking and suppressed tumor necrosis factor α release from peripheral blood monocytes after intra-articular glucocorticoid treatment. *Ann Rheum Dis.* 1998; 57:732-737.
- Straub RH, Cutolo M: Involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:493-507.
- Straub RH, Glück T, Cutolo M, Georgi J, Helmke K, Schölmerich J, Vaith P, Lang B: The adrenal steroid status in relation to inflammatory cytokines (interleukin-6 and tumor necrosis factor) in polymyalgia rheumatica. *Rheumatology.* 2000a; 39:624-631.
- Straub RH, Günzler C, Miller LE, Cutolo M, Schölmerich J, Schill S: Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro. *FASEB J.* 2002a; 16:993-1000.
- Straub RH, Kittner JM, Heijnen C, Schedlowski m, Schmidt RE, Jacobs R: Infusion of epinephrine decreases serum levels of cortisol and 17-hydroxyprogesterone in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002b; 29:1659-1664.
- Straub RH, Konecna L, Hrach S, Rothe G, Kreutz M, Schölmerich J, Falk W, Lang B: Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998a; 83:2012-2017.

- Straub RH, Lang B, Falk W, Schölmerich J, Singer EA: In vitro superfusion method for the investigation of nerve-immune cell interaction in murine spleen. *J Neuroimmunol.* 1995; 61:53-60.
- Straub RH, Mayer M, Kreutz M, Leeb S, Schölmerich J, Falk W: Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. *J Leukoc Biol.* 2000; 67:553-558.
- Straub RH, Paimela L, Peltomaa R, Schölmerich J, Leirisalo-Repo M: Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to interleukin-6 and tumor necrosis factor in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002c; 46:654-662.
- Straub RH, Pongratz G, Schölmerich J, Kees F, Schaible TF, Antoni C, Kalden JR, Lorenz HM: Long-term anti-tumor necrosis factor antibody therapy in rheumatoid arthritis patients sensitises the pituitary gland and favors adrenal androgen secretion. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:1504-1512.
- Straub RH, Schölmerich J, Zietz B: Replacement therapy with DHEA plus corticosteroids in patients with chronic inflammatory diseases – substitutes of adrenal and sex hormones. *Z Rheumatol.* 2000b; 59(suppl. 2):108-118.
- Straub RH, Vogl D, Gross V, Lang B, Schölmerich J, Andus T: Association of humoral markers of inflammation and dehydroepiandrosterone sulfate or cortisol serum levels in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterology.* 1998b; 93:2197-2202.
- Straub RH, Weidler C, Demmel B, Herrmann M, Kees F, Schmidt M, Schölmerich M, Schedel J: Renal clearance and daily excretion of cortisol and adrenal androgens in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63:961-968.
- Straub RH, Zeuner M, Lock G, Schölmerich J, Lang B: High prolactin and low dehydroepiandrosterone sulfate levels in patients with severe systemic sclerosis. *Br J Rheumatol.* 1997; 36:426-432.
- Sullivan DA, Bélanger A, Cermak JM, Bérubé R, Papas AS, Sullivan RM, Yamagami H, Dana MR, Labrie F: Are women with sjögren's syndrome androgen-deficient? *J Rheumatol.* 2003; 30:2413-2419.

- Swaneck GE, Fishman J: Covalent binding of the endogenous estrogen 16 α -hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: characterisation and intranuclear localisation. *Proc Natl Acad Sci.* 1988; 85:7831-7835.
- Takahashi H, Nakaji A, Sekihara H: Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate (DHEAS) inhibit the apoptosis in human peripheral blood lymphocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 88:261-264.
- Takahashi K-I, Fukushima K, Sasano H, Sasaki I, Matsuno S, Krozowski ZS, Nagura H: Type II 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression in human colonic epithelial cells of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 1999; 44:2516-2522.
- Tamagno E, Aragno M, Boccuzzi G, Gallo M, Parola S, Fubini B, Poli G, Danni O: Oxygen free radical scavenger properties of dehydroepiandrosterone. *Cell Biochem Funct.* 1998; 16:57-63.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; 25:1271-1277.
- Tengstrand B, Carlström K, Hafström I: Bioavailable testosterone in men with rheumatoid arthritis – high frequency of hypogonadism. *Rheumatology.* 2002; 41:285-289.
- Thieringer R, Le Grand CB, Carbin L, Cai T-Q, Wong B, Wright SD, Hermanowski-Vosatka A: 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages. *J Immunol.* 2001; 167:30-35.
- Toivanen P: From reactive arthritis to rheumatoid arthritis. *J Autoimmunity.* 2001; 16:369-371.
- Toma H, Winston JH, Micci M-A, Li H, Hellmich HL, Pasricha PJ: Characterisation of the neurotrophic response to acute pancreatitis. *Pancreas.* 2002; 25: 31-38.
- Tomlinson JW, Moore J, Cooper MS, Bujalska I, Shahmanesh M, Burt C, Strain A, Hewison M, Stewart PM: Regulation of expression of 11 β -

- hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines. *Endocrinology*. 2001; 142:1982-1989.
- Torsteinsdóttir I, Arvidson N-G, Hällgren R, Håkansson L : Monocyte activation in rheumatoid arthritis (RA) : increased integrin, Fcγ and complement receptor expression and the effect of glucocorticoids. *Clin Exp Immunol*. 1999; 115:554-560.
- Tuveri M, Generini S, Matucci-Cerinic M, Aloe L: NGF, a useful tool in the treatment of chronic vasculitic ulcers in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2000; 356:1739-1740.
- Valtysdóttir ST, Wilde L, Hällgren R: Low serum dehydroepiandrosterone sulfate in women with primary sjögren's syndrome as an isolated sign of impaired HPA-axis function. *J Rheumatol*. 2001; 28:1259-1265.
- Van den Brink HR, Wijk MJG, Geertzen RGM, Bijlsma JWW: Influence of corticosteroid puls therapy on the serum levels of soluble interleukin 2 receptor, interleukin 6 and interleukin 8 in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1994; 21:430-434.
- Van Dullemen HM, van Deventer SJH, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GNJ, Woody J: Treatment of chronic disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology*. 1995; 109:129-135.
- Van Vollenhoven RF, Park JL, Genovese MC, West JP, McGuire JL: A double-blind, placebo-controlled, clinical trial of dehydroepiandrosterone in severe systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1999; 8:181-187.
- VanderBorghet A, Geusens P, Raus J, Stinissen P: The autoimmune pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of autoreactive T-cells and new immunotherapies. *Semin Arthritis Rheum*. 2001; 31:160-175.
- Vogl D, Falk W, Dorner M, Schölmerich J, Straub RH: Serum levels of pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: relation to other adrenal hormones. *J Rheumatol*. 2003; 30:269-275.
- Wilder RL: Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1996; 23(suppl. 44):10-12.

- Williams PJ, Jones RHV, Rademacher TW: Reduction in the incidence and severity of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice, using exogenous dehydroepiandrosterone. *Arthritis Rheum.* 1997; 40:907-911.
- Wolf K, Höcherl E, Farkas T, Pfister C: Expression and dynamics of peptidergic nerve fibers in granulation tissue after distance osteosynthesis. *Unfallchirurg.* 2001; 104:948-954.
- Young DG, Skibinski G, Mason JI, James KJ: The influence of age and gender on serum dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), IL-6, IL-6 soluble receptor (IL-6 sR) and transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) levels in normal healthy blood donors. *Clin Exp Immunol.* 1999; 117:476-481.
- Zoli A, Lizzio MM, Ferlisi EM, Massafra V, Mirone L, Barini A, Scuderi F, Bartolozzi F, Magaró M: ACTH, cortisol and prolactin in active rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2002; 21:289-293.

7 Anhang

7.1 Die der Dissertation zu Grunde liegenden Originalarbeiten

- M1 Reduced capacity for the re-activation of glucocorticoids in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum.*, in Revision.
- M2 TNF inhibits dehydroepiandrosterone (DHEA) sulfate to DHEA conversion in rheumatoid arthritis synovial cells – a prerequisite for local androgen deficiency. *Arthritis Rheum.*, in Revision.
- M3 Patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus have increased renal excretion of mitogenic estrogens in relation to endogenous antiestrogens. *J Rheumatol.* 2004; 31:489-494.
- M4 Low density of sympathetic nerve fibers and increased density of brain derived neurotrophic factor – positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64:13-20.
- M5 Achilles tendinosis is associated with sprouting of substance P – positive nerve fibers, *Ann Rheum Dis.*, zur Publikation angenommen.
- M6 Dupuytren´s contracture is associated with sprouting of SP – positive nerve fibers and infiltration by mast cells. *J Rheumatol.*, zur Publikation eingereicht.

Reduced capacity for the re-activation of glucocorticoids in rheumatoid arthritis synovial cells – a possible role of the sympathetic nervous system ?

Martin Schmidt,^{1*} Claudia Weidler,^{2*} Heidrun Naumann,¹ Sven Anders,³ Jürgen Schölmerich,² Rainer H. Straub²

¹Institute of Biochemistry II, Hospital of the Friedrich-Schiller-University, 07740 Jena, Germany

²Department of Internal Medicine I, University Hospital Regensburg, 93042 Regensburg, Germany

³Department of Orthopedic Surgery, University Regensburg, Bavarian Red Cross Hospital, 93077 Bad Abbach, Germany

*These authors contributed equally.

Support: This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Schm 1611/1-1,2, Str 511/10-1,2) and by the respective institutions.

Corresponding author:

Dr. Rainer H. Straub

Laboratory of Neuroendocrinoimmunology

Department of Internal Medicine I

University Hospital Regensburg

93042 Regensburg, Germany

☎ +49 941 944 7120

📠 +49 941 944 7121

email: rainer.straub@klinik.uni-regensburg.de

(ABSTRACT)

Objective. Cortisol, the biologically active glucocorticoid, is a major endogenous antiinflammatory factor in RA. Local conversion of cortisol to biologically inactive cortisone and *vice versa* (the cortisol \leftrightarrow cortisone shuttle) has never been extensively investigated in a large number of patients with RA and OA.

Methods. In this study, we investigated the cortisol to cortisone shuttle in mixed synovial cells making use of thin layer chromatography and phosphorimaging. By double immunohistochemistry we assessed the key enzymes, the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) 1 and 2, and their possible cellular location.

Results. Double immunohistochemistry demonstrated 11 β HSD 1 / 2 positive macrophages in the sub-lining area. The ratio of 11 β HSD2 positive cells / 11 β HSD1 positive cells was higher in RA as compared to OA ($p=0.021$). Cortisol was converted to inactive cortisone in mixed synovial cells of RA and OA patients, which was largely inhibited by carbenoxolone (inhibitor of 11 β HSD 1 and 2). Using metyrapone to inhibit the reducing 11 β HSD 1 – reaction (cortisone \rightarrow cortisol), we were able to demonstrate that the capacity for the re-activation of cortisone to cortisol was higher in OA than in RA ($p=0.003$). Although the capacity for the cortisone to cortisol shuttle was higher in synovial cells of less inflamed OA tissue as compared to inflamed RA tissue, it was obvious that synovial inflammation in RA was positively related to re-activation of cortisone (not in OA). This indicates that in RA another cause, apart from typical inflammatory factors, inhibits re-activation of cortisone. Since isoproterenol and adenosine inhibited cortisol to cortisone shuttle, the loss of sympathetic nerve fibers (loss of β -adrenergic agonist and adenosine) may be the missing link for increased cortisol to cortisone shuttle in RA.

Conclusions. This study demonstrates a reduced capacity of local re-activation of cortisone in RA synovial cells. Since synthetic glucocorticoids also use this re-activation shuttle the same applies for therapeutic glucocorticoids. This defective re-activation of cortisone may be an important unrecognized pathophysiological factor in RA.

(Introduction)

Cortisol or therapeutic glucocorticoids are inactivated to biologically cortisone or therapeutic glucocorticoids via the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) (1, 2). The cortisol to cortisone shuttle is a bi-directional reaction whereby the enzyme 11 β HSD 1 mediates an oxidizing as well as reducing reaction (cortisol \leftrightarrow cortisone), and 11 β HSD 2 only catalyzes the oxidation (cortisol \rightarrow cortisone) (Fig. 1A). The corresponding human gene for the 11 β HSD 1 is located on chromosome 1 (3), whereas the gene of the 11 β HSD 2 is located on chromosome 16 (2). The balance of these two enzymes is a key factor for the availability of biologically active cortisol in the tissue (1, 2). Early work from the 1960s demonstrated that synovial tissue of RA patients is able to interconvert cortisol and cortisone and that interconversion is not solely restricted to hepatic tissue (4). It was demonstrated that these enzymes are also active in murine leukocytes (5), and differentiation of monocytes to macrophages was accompanied by upregulation of the 11 β HSD 1 (6). It was further demonstrated that key proinflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF α stimulate the cortisone to cortisol shuttle – the re-activation of cortisone (7-10). Such a reaction would increase the biologically active cortisol in inflamed tissue which can be necessary to counteract inflammation.

From this point of view, we would expect a reduced shuttle from cortisol to cortisone and an increased shuttle back from cortisone to cortisol in tissue of patients with RA. It was speculated that therapeutic inhibition of cortisol to cortisone shuttle would ameliorate inflammation in chronic inflammatory diseases. Indeed, it has been shown that inhibition of this pathway by glycyrrhetinic acid strongly inhibited experimental dermatitis by potentiation of glucocorticoid effects (11). Others have found that protein and mRNA expression of the 11 β HSD 2 was reduced in ulcerative colitis which demonstrates that this enzyme may play a role in human chronic inflammatory diseases (12). It was also shown that 11 β HSD 2 is active in tissue of Crohn's disease, ulcerative colitis, and diverticulitis (13). Although this bi-directional hormone shuttle may be of high importance in chronic inflammatory diseases no studies are available which have compared this reaction in primary cells of patients with RA and OA. We hypothesized that cortisol / cortisone shuttle is altered in RA as compared to OA patients. Such changes may be due to proinflammatory and other factors in the tissue.

This study was initiated in order to demonstrate the presence of 11 β HSD 1 and 2 in synovial tissue of patients with RA and OA. We functionally tested cortisol to cortisone shuttle in mixed synovial cells of RA and OA patients and tried to find factors which influence this particular enzyme step in primary synovial cells.

PATIENTS AND METHODS

Patients. In this study, 11 patients with long-standing RA fulfilling the American College of Rheumatology criteria for RA (14) and 14 patients with OA were included. These patients underwent elective knee joint replacement surgery. They were informed about the purpose of the study and gave written consent. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Regensburg. Basic clinical and laboratory data are given in table 1. Parameters such as C-reactive protein and rheumatoid factor were measured by standard techniques as described earlier (15).

Synovial tissue preparation. Synovial tissue samples were obtained immediately after opening the knee joint capsule and preparation of which was described (16). A piece of synovial tissue of up to 9 cm² was dissected. A larger piece of the synovial tissue was used to isolate mixed synovial cells (see below), and approximately 8 pieces of the same synovial area were used for histology: Samples intended for hematoxylin–eosin (HE) staining and alkaline phosphatase – anti-alkaline phosphatase (APAAP) staining were immediately placed in protective freezing medium (Tissue Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, The Netherlands) and then quick-frozen. Tissue samples for the detection of nerve fibers were fixed for 12 to 24 hr in phosphate buffered saline (PBS) containing 3.7% formaldehyde and then incubated in PBS with 20% sucrose for 12 - 24 hr. Thereafter, tissue was embedded in Tissue Tek and quick-frozen. All tissue samples were stored at -80°C.

Histological evaluation and determination of synovial innervation. Histological evaluation was carried out as described previously (15). From 5-7 µm thick sections, cell density and lining layer thickness were determined of about 45 sections from at least 3 different tissue samples per patient (HE stain). The overall cell density was determined by counting all stained cell nuclei in 17 randomly selected high power fields of view (400x). The lining layer thickness was analyzed by averaging the number of cells in a lining layer cross section at 9 different locations (400x). To determine the number of T-cells (CD3, Dako, Hamburg, Germany), macrophages (CD163, Dako), and vessels (collagen IV, Dako), 8 cryosections were investigated using APAAP staining and the number of identified structures was averaged from 17 randomly selected high power fields (400x). The number of investigated high power fields was derived from a pioneering histological study of Bresnihan et al. (17).

For the determination of synovial innervation 6 to 8 cryosections (5-7 μm thick) were used for immunohistochemistry with a primary antibody against tyrosine hydroxylase (TH, the key enzyme for norepinephrine production in sympathetic nerve endings, Chemicon, Temecula, CA, USA) (15), and an Alexa 546 conjugated secondary antibody (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). The numbers of sympathetic nerve fibers per mm^2 were determined by averaging the number of stained nerve fibers (minimum length 50 μm , determined through a micrometer eyepiece) in 17 randomly selected high power fields of view (400x).

Immunohistochemistry of the 11 β HSD 1 and 2. Human 11 β HSD 1 and 2 were detected and double stained using immunofluorescence. Crysections were blocked and then incubated overnight with polyclonal antibodies against the two enzymes (11 β HSD 1 from Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, 11 β HSD 2 from Alpha Diagnostic International Inc., San Antonio, Texas, U.S.A.) each together with a monoclonal antibody against activated macrophages (CD163, DakoCytomation, Carpinteria, California, U.S.A.). After three washes, staining of the positive cells was achieved by incubating the sections with respective secondary Alexa Fluor 488 and 555 F(ab')₂ fragments (Molecular Probes, Eugene, Oregon, U.S.A.). Nuclei were stained with Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, California, U.S.A.). The numbers of 11 β HSD 1 and 2-positive cells per mm^2 were determined in 17 randomly selected high power fields of view (400x).

Isolation and culture of primary mixed synovial cells. Mixed synovial cells were isolated by enzymatic digestion of fresh synovial tissue for 1-2 hr at 37°C using Dispase (Grade II, Boehringer, Mannheim, Germany). The synovial cells were re-suspended in RPMI 1640 medium (Sigma, Taufkirchen, Germany), supplemented with 10% FCS (Sigma, Taufkirchen, Germany), 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies Inc., Paisley, U.K.), 0.1% amphotericin B (Bristol-Myers Squibb, Munich, Germany) and 4 ml/l ciprofloxacin (Bayer, Leverkusen, Germany). The cells were stored for 24 hr in teflon bags (Heraeus, Hanau, Germany) for immediate 4°C express shipping to the University of Jena (M.S.). After removal from the teflon bags, synoviocytes were washed twice with serum-free RPMI medium (Biochrom, Berlin, Germany). Roughly 3-4 x 10⁵ viable cells per well were placed into 6-well plates in a final volume of 3 ml and incubated for 3 hr. There was no difference in viability between cells obtained from OA and RA patients, respectively. During culture, cells were kept in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at a temperature of 37°C. After 3 hr, cells were subjected to incubation with radiolabelled cortisol with/without additional test compounds (see below).

Incubation with radiolabelled cortisol, steroid extraction, and thin layer chromatography. Solvents and other reagents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), if not stated otherwise. Unlabelled steroids, substance P, a substance P receptor antagonist (L-703606), adenosine, and isoproterenol were from Sigma (Taufkirchen, Germany). Furthermore, we used the enzyme inhibitors metyrapone (Sigma, Taufkirchen, Germany) and carbenoxolone (Sigma, Taufkirchen, Germany) as well as TNF α (PeproTech, Rocky Hill, USA), and infliximab (Essex-Pharma, München, Germany). Radioactive [4- 14 C]cortisol was purchased from PerkinElmer (Rodgau, Germany). Metyrapone and carbenoxolone were used at 100 μ M and 5 μ M, respectively, because these concentrations demonstrated maximal effects (18, 19).

After addition of various compounds or vehicles, respectively, cells were incubated with 0.249 μ M [4- 14 C]cortisol (1979.5 MBq/mmol; PerkinElmer, Rodgau, Germany) for another 48 hr. We used this cortisol concentration because it reflects the normal serum concentration (20). The time window was chosen, because it was well within the time window of linear product accumulation (data not shown). Then, the culture supernatants were transferred to polypropylene tubes and centrifuged at 4°C at 600 g for 5 min. Steroids were extracted twice with 3 ml cold ethyl acetate. The exact concentrations of radiolabelled cortisol applied to each well and the extraction efficiencies were monitored by liquid scintillation counting of aliquots. More than 90% of the total radioactivity was routinely recovered in the organic phase, which was lyophilized in a speed-vac concentrator (Saur, Reutlingen, Germany) and stored at -20°C until analysis.

Lyophilized extracts were dissolved in 50 μ l ethanol. Samples of 10 μ l were spotted on silica gel 60 F254 thin-layer chromatography (TLC) aluminum sheets and developed in chloroform : ethyl acetate : ethanol (20:5:1). Unlabelled cortisol and cortisone, 10 μ g each per lane, were used as carriers and for identification of corresponding spots on the TLC plates under UV illumination. Radioactivity on the TLC-plates was quantified by phosphorimaging (FLA 3000, Fuji-Raytest, Straubenhardt, Germany). Spots were assigned only, if their intensity was more than two standard deviations above background. All TLC analyses were repeated twice for each sample. The results are calculated and given as pmoles cortisone produced by 10^6 cells in a 48 hr incubation period. Calculations based on the amounts of cortisol used gave essentially the same results.

The re-activation ratio. Radiolabelled cortisol is converted to cortisone and again back to cortisol by the bi-directional reaction of 11 β HSD 1 and 11 β HSD 2 (Fig. 1A). Re-activation of cortisone is made possible by the 11 β HSD 1 and this pathway can be blocked by metyrapone at 100 μ mol/l (19). Due to the

amount of synovial cells available, metyrapone was used at 100 µmol/l in order to test the pathways of the 11βHSD 1 and 11βHSD 2 with only one radiolabelled compound (cortisol). In order to find a measure for re-activation of cortisone (cortisone → cortisol), a ratio of cortisone production with metyrapone divided by cortisone production without metyrapone was calculated according to the following formula:

$$\text{re-activation ratio} = \frac{\text{cortisone}_{\text{Metyrapone}}}{\text{cortisone}}$$

This ratio is an excellent indicator of the capacity to re-activate cortisone (cortisone → cortisol). This particular ratio was denominated the *re-activation ratio*.

Presentation of data and statistical analysis. All data are given as means ± SEM. When variables were normally distributed paired or unpaired t-test were used, otherwise the Mann-Whitney test for unpaired data or the Wilcoxon test for paired data were used (SPSS / PC, V.11.5, SPSS Inc., Chicago, USA). Correlations were calculated by Spearman rank correlation analysis (SPSS). p<0.05 was the level of significance.

RESULTS

Markers of inflammation in synovial tissue. In order to delineate severity of local tissue inflammation, we investigated lining layer thickness, overall cellularity, density of CD3⁺ T cells, CD163⁺ macrophages, and vascularity. Obviously, patients with RA had more severe inflammation as compared to patients with OA (Table 1).

Immunohistochemistry of 11βHSD 1 and 2. Cells positive for 11βHSD 1 and 2 were detected in the sublining area of synovial tissue of patients with RA and OA. Double staining identified CD163 positive macrophages with 11βHSD 1 and 2 (Fig. 1). The number of 11βHSD 1 (11βHSD 2) positive cells was somewhat lower (higher) in RA as compared to OA (Fig. 1D) but this did not reach the significance level. Calculation of the ratio of 11βHSD 2 positive cells divided by 11βHSD 1 positive cells revealed a significant increase in RA as compared to OA (Fig. 1E).

Interconversion of cortisol and cortisone. Figure 2 demonstrates that cortisol is converted to cortisone as exemplified in an OA patient. It is demonstrated that metyrapone, an inhibitor of the reducing

reaction of 11 β HSD 1 increased cortisone production (Fig. 2, lane 5/6). Since cortisone production under metyrapone is markedly higher than without this compound (Fig. 2, compare lane 3/4 with lane 5/6), a significant part of cortisone is shifted back to cortisol via the 11 β HSD 1 under conditions without metyrapone. The overall inhibitor of 11 β HSD 1 and 2, carbenoxolone, largely inhibited conversion from cortisol to cortisone (Fig. 2, lane 7/8). In further experiments on 4 RA and 4 OA patients, we quantified the effects of carbenoxolone with/without metyrapone (Fig. 3). Under conditions with/without metyrapone, carbenoxolone nearly completely inhibited inactivation of cortisol, which was significant in OA and tended to be significant in RA (Fig. 3A,B).

To further quantify effects of metyrapone, synovial cells of 11 RA and 14 OA patients were investigated (Fig. 4). It is obvious that metyrapone led to a strong inhibition of re-activation of cortisone (cortisone \rightarrow cortisol) in OA patients which was not significant in RA (Fig. 4A). This indicates that this particular reaction was more prominent in OA synovial cells and did nearly not happen in RA synovial cells (Fig. 4A). The re-activation ratio was significantly higher in OA as compared to RA (Fig. 4B).

Re-activation of cortisone and inflammation. Inflammation may have an impact on re-activation of cortisone because it has been demonstrated that cytokines such as TNF α and IL-1 β influence 11 β HSD (7-10). It seems that a status with less inflammation in OA patients was not linked to increased or decreased re-activation of cortisone (no significant correlations between synovial cellularity and reactivation ratio: $R=0.370$, n.s., and between T cell density and re-activation ratio: $R=-0.080$, n.s.). However, in RA patients an increased inflammatory status evaluated by cellularity and T cell density significantly correlated with an increased re-activation ratio (cellularity: $R=0.860$, $p=0.002$; T cell density: $R=0.720$, $p=0.019$). Although the general level of re-activation of cortisone is much lower in RA than in OA (Fig. 4B), a higher inflammatory status seems to be linked to an increased re-activation of cortisone.

There was no interrelation between re-activation of cortisone and therapeutically administered drugs (NSAIDs: $p=0.045$, prednisolone: $p=0.32$).

Re-activation of cortisone and proinflammatory factors and sympathetic neurotransmitters.

Above data indicated that, apart from inflammatory mediators, another causal factor may be involved in low re-activation of cortisone in RA patients. In our earlier studies, we have demonstrated a dramatic loss of sympathetic nerve fibers in synovial tissue of patients with RA as compared to OA (15, 21). In this study we were able to confirm the significant loss of sympathetic nerve fibers in patients with RA as compared to OA (Fig. 5A). This prompted us to study two typical neurotransmitter pathways mediated by the

sympathetic nervous system: via the β -adrenoceptor (using isoproterenol, a specific $\beta_{1,2}$ -adrenergic agonist) and via the adenosine receptor A2 (using high concentrations of adenosine). Isoproterenol and adenosine inhibited conversion of cortisol to cortisone (Fig. 5B). Isoproterenol demonstrated a dose-response relationship (Fig. 5C). Other mediators such as TNF α , infliximab (anti-TNF α antibody), substance P, and a substance P receptor inhibitor did not influence this conversion step (Fig. 5B). This indicates that sympathetic neurotransmitters influence the oxidizing capacity of the 11 β HSD 1 or 11 β HSD 2 (cortisol \rightarrow cortisone).

DISCUSSION

Cortisol conversion to cortisone is an important mechanism in order to inactivate the biologically active endogenous glucocorticoid. Inactivation can play an important role for generation of an inflammatory milieu, which is very important in *Listeria monocytogenes* infection (22): Defense mechanisms which control the progressive growth of *Listeria monocytogenes* in normal mice *in vivo* are dependent upon inactivation of endogenous glucocorticoids by the 11 β HSD, because pharmacological inhibition of 11 β HSD largely increased host susceptibility to progressive bacterial disease (22). One may hypothesize that inactivation of cortisol in peripheral tissue has been evolutionarily conserved in order to protect the host from bacterial invasion. Inactivation of cortisol can also be important in chronic inflammatory diseases.

In this comparative study of RA and OA synovial cells, we were able to demonstrate that re-activation of cortisone via the reducing capacity of the 11 β HSD 1 (cortisone \rightarrow cortisol, see Fig. 1A) was significantly decreased in RA as compared to OA. Thus, the supply of cortisol by re-activation of cortisone is obviously different in these two diseases. The question arises whether, or not, administered prednisolone has modulated these effects in our RA patients. It has been demonstrated in human osteoblasts that glucocorticoids can increase the activity of the 11 β HSD 1 *in vitro* (cortisone \rightarrow cortisol) (23). Under consideration of this information, one would expect an increased re-activation of cortisone in chronically glucocorticoid treated RA patients as compared to OA. However, this present study demonstrated decreased re-activation of cortisone in RA, which makes it unlikely that administered prednisolone has largely influenced our results.

In the sixties of the last century, it has been shown that synovial tissue is able to interconvert cortisol and cortisone (4). At this time, the responsible enzymes have not been cloned, and respective inhibitors were not known in detail. In this study of Murphy and West, it was demonstrated in synovial tissue that

cortisol inactivation was increased in two patients with RA as compared to two patients with diabetes (as controls) (4). However, a detailed statistical analysis was not possible due to the low numbers of investigated patients. In our study, it turned out that particularly re-activation of cortisone is markedly lower in RA than in OA patients. Furthermore, it turned out that carbenoxolone, an inhibitor of the entire reaction of the 11 β HSD 1 and 11 β HSD 2 nearly completely abolished cortisol inactivation. Such a pharmacological effect can be an important therapeutical principle which has been demonstrated in dermatitis in mice (11). Interestingly, no such therapeutical principle has ever been introduced into pharmacological treatment of patients with RA or other chronic inflammatory diseases.

Since RA is a disease with strong inflammation, key cytokines such as TNF α may play a role in cortisol inactivation. It has been demonstrated that IL-1 β and TNF α stimulate re-activation of cortisone in peripheral tissue (7-10). Such a reaction would increase the biologically active cortisol in inflamed tissue, which can be necessary to counteract inflammation in RA. In this study, we confirmed that proinflammatory factors were positively correlated to increased re-activation of cortisone in RA but not in OA. However, the level of re-activation of cortisone was largely lower in RA as compared to OA. At this point, the question arises whether, or not, other factor apart from proinflammatory cytokines can inhibit re-activation of cortisone.

In recent years, we demonstrated a dramatic loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with RA as compared to OA (15, 21). In parallel, tissue innervation with sensory substance P – positive nerve fibers remains relatively stable (15, 21). Such a dysbalance between sympathetic and sensory nerve fibers may influence local cortisol availability. Indeed, it has been demonstrated that an increase of the second messenger cAMP of the β -adrenergic signaling pathway inhibits both, the 11 β HSD 1 and 2 (24). In another study with Leydig cells, adenosine, another sympathetic neurotransmitter, increased cortisone re-activation (25). These results may indicate that sympathetic neurotransmitters increase local cortisol concentration by inhibition of cortisol inactivation or increased re-activation of cortisone. In this present study, we were able to demonstrate that isoproterenol, a β -adrenergic receptor agonist, and adenosine inhibited cortisol inactivation particularly in OA but less in RA patients. The lower influence of these neurotransmitters in RA may be due to reduced neurotransmitter receptor density on local cells (26).

At this point, we recall the general cooperativity of sympathetic neurotransmitters on one hand and glucocorticoids on the other: In asthma therapy parallel topical (or systemic) treatment with a β -adrenergic agonist and corticosteroids (CS) has an additive anti-obstructive effect (27). Cooperative effects of cortisol and norepinephrine lead to an increase of glucocorticoid receptors, β -adrenoceptors, intracellular cAMP,

protein kinase A, and cAMP responsive element binding protein, a sequence of events which has been demonstrated in various cell types (28-35). Increase of these intracellular mediators is accompanied by a dramatic antiinflammatory response in various immune cells (36, 37). Furthermore, cortisol supports production of norepinephrine and epinephrine from sympathetic nerve terminals and adrenal medulla by inducing the synthesizing enzymes (38, 39). In synovial cells, cooperativity of norepinephrine and cortisol lead to decreased production of TNF α , IL-6, and IL-8 (40). From this point of view, the above mentioned influence of sympathetic neurotransmitters on cortisol inactivation would be an additional way in order to sustain cooperativity of these two systems. One may speculate that loss of sympathetic nerve fibers together with a decrease of β -adrenoceptor density on RA leukocytes is an important causal factor for low cortisol availability in inflamed tissue.

In conclusion, this study demonstrated a reduced capacity of local re-activation of cortisone in rheumatoid arthritis synovial cells as compared to OA synovial cells. Since synthetic glucocorticoids also use this re-activation shuttle the same applies for therapeutic glucocorticoids. This defective re-activation of cortisone may be an important unrecognized pathophysiological factor for the perpetuation of inflammation in RA.

Acknowledgement

We thank Angelika Gräber for excellent technical assistance.

References

1. Monder C, White PC. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm* 1993;47:187-271.
2. Agarwal AK, Rogerson FM, Mune T, White PC. Gene structure and chromosomal localization of the human HSD11K gene encoding the kidney (type 2) isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Genomics* 1995;29:195-9.
3. Tannin GM, Agarwal AK, Monder C, New MI, White PC. The human gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1991;266:16653-8.
4. Murphy D, West HF. Catabolism and interconversion of cortisol and cortisone in human synovial tissue in vitro. *Ann Rheum Dis* 1969;28:637-43.
5. Hennebold JD, Ryu SY, Mu HH, Galbraith A, Daynes RA. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase modulation of glucocorticoid activities in lymphoid organs. *Am J Physiol* 1996;270:R1296-R1306.
6. Thieringer R, Le Grand CB, Carbin L, Cai TQ, Wong B, Wright SD, et al. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages. *J Immunol* 2001;167:30-5.
7. Escher G, Galli I, Vishwanath BS, Frey BM, Frey FJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta enhance the cortisone/cortisol shuttle. *J Exp Med* 1997;186:189-98.
8. Handoko K, Yang K, Strutt B, Khalil W, Killinger D. Insulin attenuates the stimulatory effects of tumor necrosis factor alpha on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in human adipose stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;72:163-8.
9. Tomlinson JW, Moore J, Cooper MS, Bujalska I, Shahmanesh M, Burt C, et al. Regulation of expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines. *Endocrinology* 2001;142:1982-9.
10. Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, Walker EA, Bland R, Sheppard MC, et al. Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *J Bone Miner Res* 2001;16:1037-44.
11. Hennebold JD, Daynes RA. Inhibition of skin 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in vivo potentiates the anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Arch Dermatol Res* 1998;290:413-9.
12. Takahashi KI, Fukushima K, Sasano H, Sasaki I, Matsuno S, Krozowski ZS, et al. Type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human colonic epithelial cells of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1999;44:2516-22.
13. Burton AF, Anderson FH. Inactivation of corticosteroids in intestinal mucosa by 11 beta-hydroxysteroid: NADP oxidoreductase (EC 1.1.1.146). *Am J Gastroenterol* 1983;78:627-31.
14. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
15. Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 2000;14:2097-107.

16. Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Schölmerich J, et al. Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1156-63.
17. Bresnihan B, Cunnane G, Youssef P, Yanni G, Fitzgerald O, Mulherin D. Microscopic measurement of synovial membrane inflammation in rheumatoid arthritis: proposals for the evaluation of tissue samples by quantitative analysis. *Br J Rheumatol* 1998;37:636-42.
18. Li KX, Obeyesekere VR, Krozowski ZS, Ferrari P. Oxoreductase and dehydrogenase activities of the human and rat 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Endocrinology* 1997;138:2948-52.
19. Sampath-Kumar R, Yu M, Khalil MW, Yang K. Metyrapone is a competitive inhibitor of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 reductase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;62:195-9.
20. Greenspan FS, Gardner DG. Basic and clinical endocrinology. New York: Lange Medical-Books/McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2004.
21. Miller LE, Grifka J, Schölmerich J, Straub RH. Norepinephrine from synovial tyrosine hydroxylase positive cells is a strong indicator of synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:427-35.
22. Hennebold JD, Mu HH, Poynter ME, Chen XP, Daynes RA. Active catabolism of glucocorticoids by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vivo is a necessary requirement for natural resistance to infection with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunol* 1997;9:105-15.
23. Cooper MS, Rabbitt EH, Goddard PE, Bartlett WA, Hewison M, Stewart PM. Osteoblastic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity increases with age and glucocorticoid exposure. *J Bone Miner Res* 2002;17:979-86.
24. Hammami MM, Siiteri PK. Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human skin fibroblasts: enzymatic modulation of glucocorticoid action. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:326-34.
25. Ferguson SE, Pallikaros Z, Michael AE, Cooke BA. The effects of different culture media, glucose, pyridine nucleotides and adenosine on the activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999;158:37-44.
26. Baerwald CG, Laufenberg M, Specht T, von Wichert P, Burmester GR, Krause A. Impaired sympathetic influence on the immune response in patients with rheumatoid arthritis due to lymphocyte subset-specific modulation of beta 2-adrenergic receptors. *Br J Rheumatol* 1997;36:1262-9.
27. Motulsky HJ, Insel PA. Adrenergic receptors in man: direct identification, physiologic regulation, and clinical alterations. *N Engl J Med* 1982;307:18-29.
28. Oikarinen J, Hamalainen L, Oikarinen A. Modulation of glucocorticoid receptor activity by cyclic nucleotides and its implications on the regulation of human skin fibroblast growth and protein synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1984;799:158-65.
29. Gruol DJ, Campbell NF, Bourgeois S. Cyclic AMP-dependent protein kinase promotes glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem* 1986;261:4909-14.
30. Nakada MT, Stadel JM, Poksay KS, Crooke ST. Glucocorticoid regulation of beta-adrenergic receptors in 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Pharmacol* 1987;31:377-84.
31. Dong Y, Aronsson M, Gustafsson JA, Okret S. The mechanism of cAMP-induced glucocorticoid receptor expression. Correlation to cellular glucocorticoid response. *J Biol Chem* 1989;264:13679-83.

32. DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Pelletier JP. Modulation of glucocorticoid receptor expression in human articular chondrocytes by cAMP and prostaglandins. *J Rheumatol Suppl* 1991;27:102-5:102-5.
33. Korn SH, Wouters EF, Wesseling G, Arends JW, Thunnissen FB. Interaction between glucocorticoids and beta2-agonists: alpha and beta glucocorticoid-receptor mRNA expression in human bronchial epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 1998;56:1561-9.
34. Eickelberg O, Roth M, Lox R, Bruce V, Rudiger J, Johnson M, et al. Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by beta2-adrenergic receptor agonists in primary human lung fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999;274:1005-10.
35. Schmidt P, Holsboer F, Spengler D. beta(2)-Adrenergic Receptors Potentiate Glucocorticoid Receptor Transactivation via G Protein betagamma-Subunits and the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Mol Endocrinol* 2001;15:553-64.
36. Renz H, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gerns D. Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J Immunol* 1988;141:2388-93.
37. Johnson KW, Davis BH, Smith KA. cAMP antagonizes interleukin 2-promoted T-cell cycle progression at a discrete point in early G1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:6072-6.
38. Brion F, Parvez H, Parvez S, Marnay-Gulat C, Raoul Y. Effects of glucocorticoids upon adrenal and urinary epinephrine and norepinephrine and the activity of enzyme phenylethanolamine-N-methyltransferase in rats made partially deficient in vitamin D: role of vitamin D supplementation. *Horm Metab Res* 1978;10:556-60.
39. Schubert D, LaCorbiere M, Klier FG, Steinbach JH. The modulation of neurotransmitter synthesis by steroid hormones and insulin. *Brain Res* 1980;190:67-79.
40. Straub RH, Günzler C, Miller LE, Cutolo M, Schölmerich J, Schill S. Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro. *FASEB J* 2002;16:993-1000.

Table 1 Basic and histological characteristics of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis who underwent knee-joint replacement surgery. Data are given as means \pm SEM, percentages are given in parentheses.

	Osteoarthritis	Rheumatoid arthritis
Number of patients	14	11
Age (yr)	71.3 \pm 2.4	66.6 \pm 3.2
Gender m/f	3 / 11	3 / 8
Disease duration (yr)	n.a.	11.6 \pm 2.0
C-reactive protein (mg/l)	6.2 \pm 1.1	31.4 \pm 12.0**
Presence of rheumatoid factor (n / %)	n.a.	8 (73)
Lining layer thickness (number of cells)	2.0 \pm 0.2	3.9 \pm 0.4**
Overall cellularity (cells / mm ²)	1202 \pm 175	2046 \pm 309*
CD3 ⁺ T cell density (cells / mm ²)	28.2 \pm 9.4	83.3 \pm 34.7
CD163 ⁺ macrophages (cells / mm ²)	47.6 \pm 10.6	126.1 \pm 32.8*
Vascularity (vessels / mm ²)	25.0 \pm 1.6	34.5 \pm 6.0
Medication		
Prednisolone (n / %)	0 (0)	9 (82)
Methotrexate (n / %)	0 (0)	2 (18)
Sulfasalazine (n / %)	0 (0)	1 (9)
Leflunomide (n / %)	0 (0)	3 (27)
Chloroquine / hydroxychloroquine (n / %)	0 (0)	3 (27)
Azathioprine (n / %)	0 (0)	1 (9)
Cyclosporin A (n / %)	0 (0)	1 (9)
COX2 inhibitors (n / %)	2 (14)	3 (27)
NSAID (unspecific COX1/2 inhibitors) (n / %)	8 (57)	10 (91)

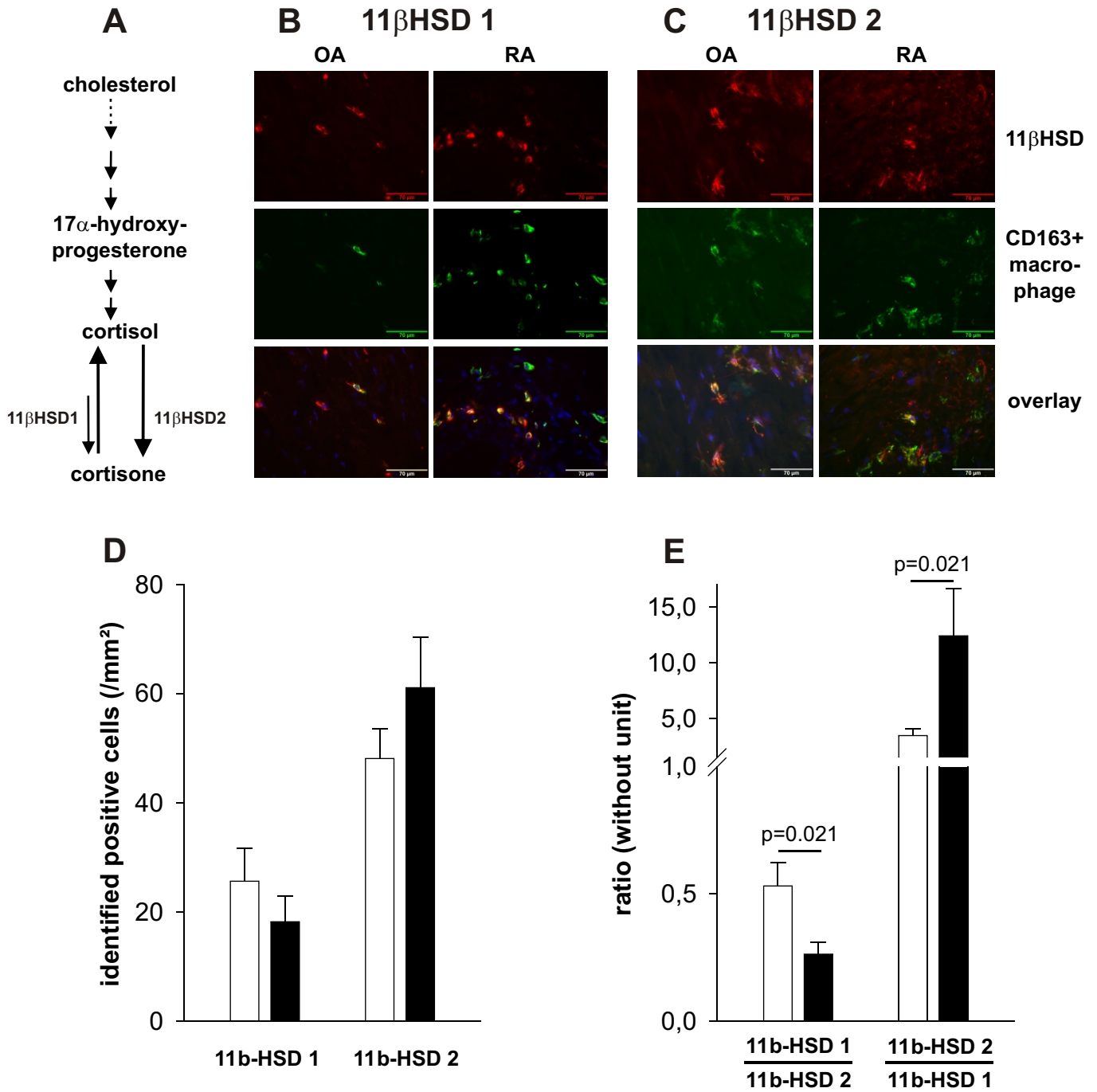
*p < 0.05, **p < 0.01 vs. osteoarthritis. Abbreviation: n.a., not applicable

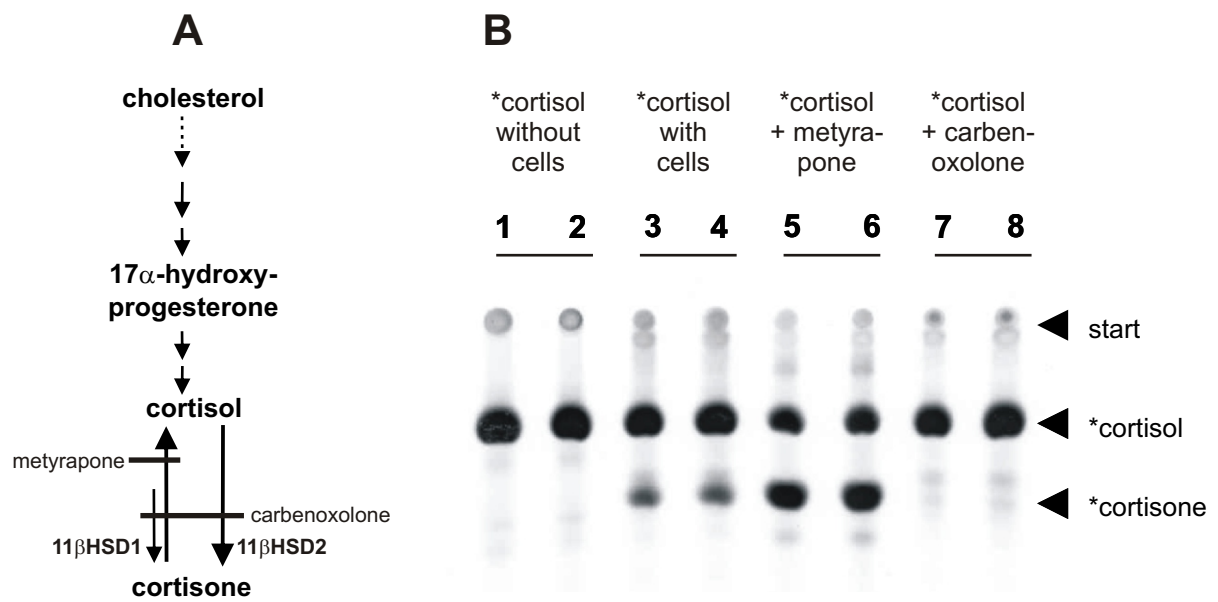
Figure legends

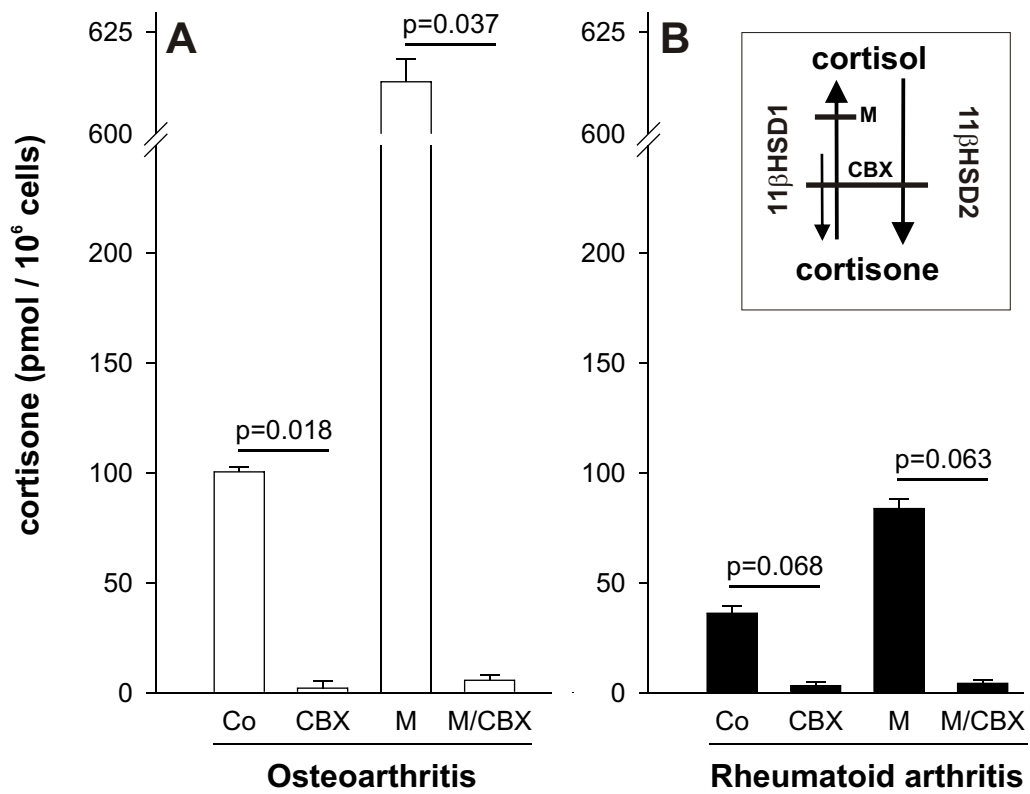
- Figure 1** Identification of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) 1 and 2. A) This graph schematically depicts cortisol production and inactivation. B) and C) Immunohistochemistry of 11 β HSD 1 and 11 β HSD 2 in osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) patients. Magnification 400x. D) Density of 11 β HSD 1 and 2 positive cells per mm² in patients with OA (white bars) and RA (black bars). A total of 17 randomly selected high power fields (440x) was investigated in each patient. E) Ratio of 11 β HSD 1 positive cells divided by 11 β HSD 2 positive cells and vice versa. Data in panels D) and E) are given as means \pm SEM.
- Figure 2** Analysis of cortisol metabolism by thin-layer chromatography. A) The graph schematically depicts glucocorticoid interconversion via the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases (11 β HSD). The points of action of applied inhibitors of the 11 β HSD 1 and 11 β HSD 2 are demonstrated. B) In a representative experiment, synovial cells from a patient with OA were isolated and cultured as described in Materials and Methods. Cells were incubated with 249 nM [4-¹⁴C]cortisol for 48 hr in serum-free RPMI medium. The positions of radio-labelled cortisol (*cortisol) and *cortisone are indicated: *cortisone is the major product. Samples were spotted in duplicate at the position indicated (start): 1+2, no synovial cells; 3+4, untreated synovial cells (control); 5+6, synovial cells treated with 100 μ M metyrapone; 7+8, synovial cells treated with 5 μ M carbenoxolone.
- Figure 3** 11 β HSD inhibition blocks cortisone production in osteoarthritis (A) and rheumatoid arthritis (B). Synovial cells from 4 OA patients and from 4 RA patients were isolated, cultured and analyzed as described in Materials and Methods. Cells were treated with 100 μ M metyrapone (M) or 5 μ M carbenoxolone (CBX), or respective vehicles, as indicated. All data are given as means \pm SEM. The insert demonstrates the points of action of investigated inhibitors in OA and RA synovial cells.

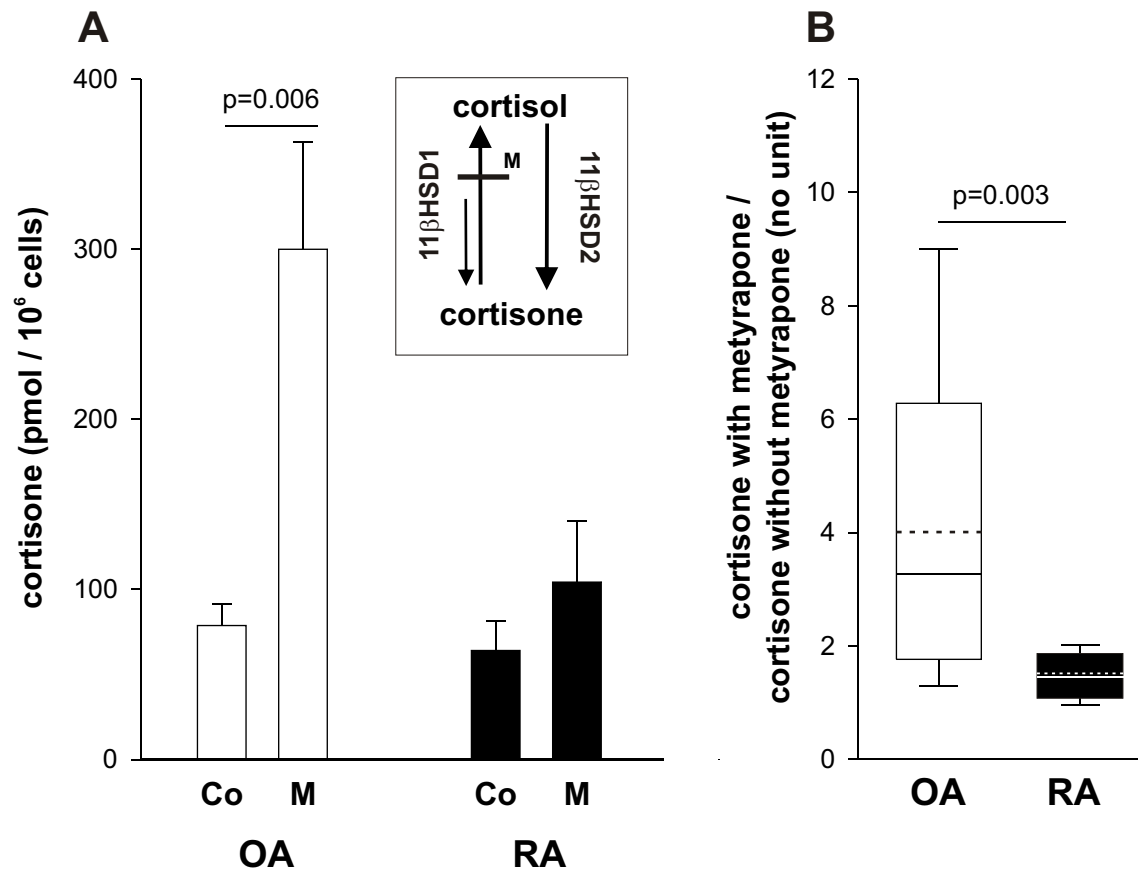
Figure 4 Re-activation of cortisone in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. A) Different 11 β HSD reductase activity in OA versus RA patients. Synoviocytes of 14 OA patients and 11 RA patients were isolated and cultured as described in Materials and Methods. Cells were treated for 48 hr with radiolabelled cortisol in the absence or presence of 100 μ M metyrapone (M), which inhibits solely the reductase activity of 11 β HSD 1 in the concentration used (see insert). All data are given as means \pm SEM. B) Re-activation ratio in patients with OA and RA. This ratio indicates the amount of re-activation of cortisone (cortisone \rightarrow cortisol). For calculation of the re-activation ratio see Materials and Methods. Box plots indicate 75th/25th percentiles, whiskers indicate 90th/10th percentiles, solid lines indicate medians, and dashed lines indicate means.

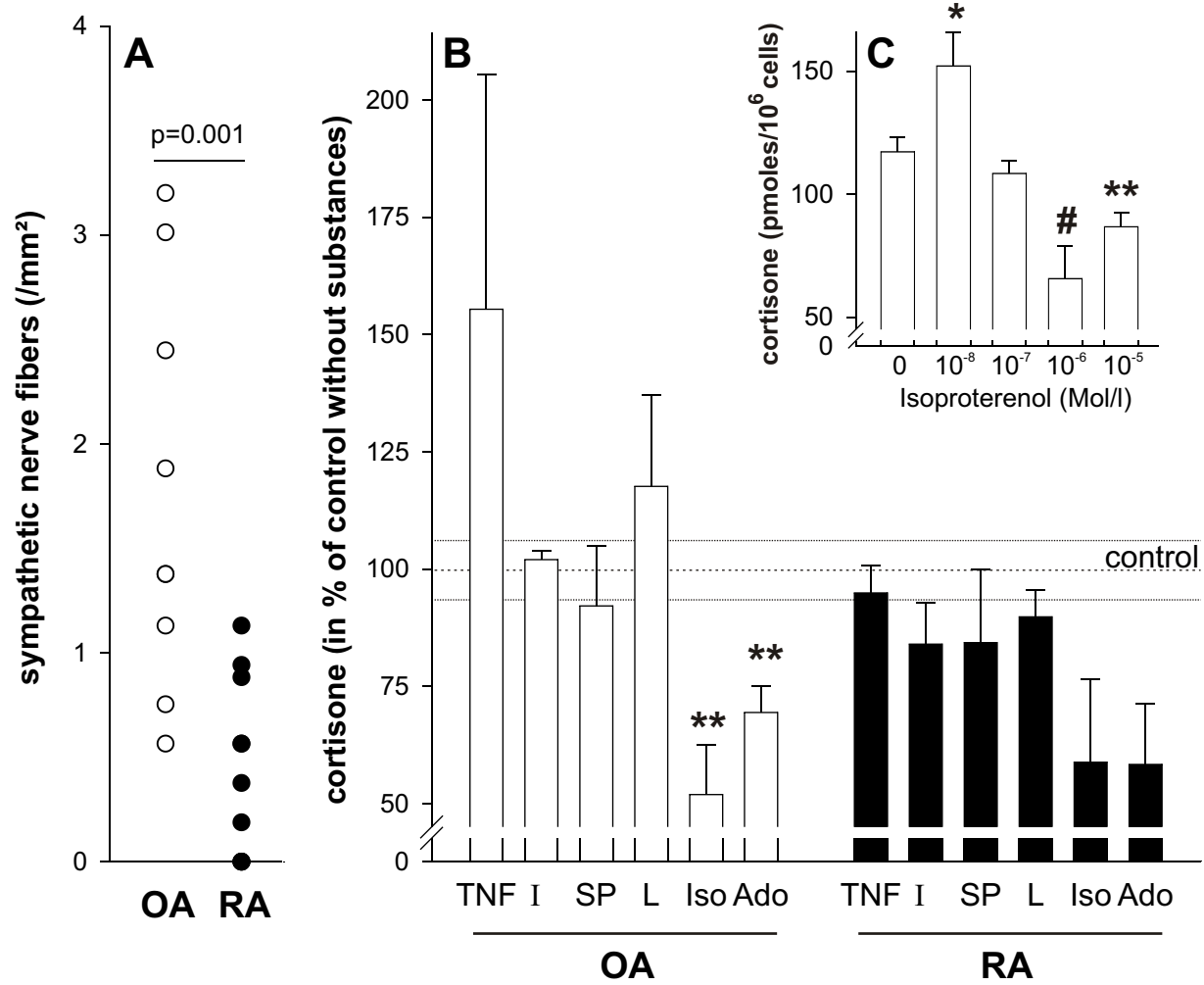
Figure 5 Sympathetic nervous system and cortisol inactivation. A) Density of sympathetic nerve fibers in patients with osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA). B) Influence of different factors on cortisol inactivation. Synovial cells were treated for 48 hr with radiolabelled cortisol in the absence or presence of different factors: TNF α (10 ng/ml); I, infliximab (3 μ g/ml); SP, substance P (10^{-9} mol/l); L, L-703606 (10^{-6} mol/l, specific substance P receptor antagonist); Iso, isoproterenol (β -adrenergic agonist: 10^{-5} mol/l); Ado, adenosine (2.5×10^{-5} mol/l). Synovial cells of at least three different patients with OA and RA were investigated. The insert (C) demonstrates the dose response curve for isoproterenol. * $p < 0.05$, ** $p < 0.020$, # $p = 0.009$ for the comparison vs. control. The horizontal lines indicate control \pm SEM. All data are given as means \pm SEM.











TNF inhibits dehydroepiandrosterone (DHEA) sulfate to DHEA conversion in rheumatoid arthritis synovial cells – a prerequisite for local androgen deficiency

Claudia Weidler,^{*1} Sona Struharova,^{*2} Martin Schmidt,³ Bernhard Ugele,⁴ Jürgen Schölmerich,¹ Rainer H. Straub¹

¹Department of Internal Medicine I., University Hospital Regensburg, 93042 Regensburg, Germany

²National Institute of Rheumatic Diseases, 92112 Piestany, Slovak Republic

³Institute of Biochemistry II, Hospital of the Friedrich-Schiller-University, 07740 Jena, Germany

⁴1.Frauenklinik Innenstadt, Klinikum der Universität München, 80337 Munich, Germany

*These authors contributed equally.

Support: This study was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Str 511/10-1,2, DAAD, Schm 1611/1-1,2) and by the respective institutions.

Corresponding author:


Dr. Rainer H. Straub


Laboratory of Neuroendocrinoimmunology

Department of Internal Medicine I

University Hospital Regensburg

93042 Regensburg, Germany

 +49 941 944 7120

 +49 941 944 7121

email: rainer.straub@klinik.uni-regensburg.de

(ABSTRACT)

Objective. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis (RA) has expanded our understanding about possible mechanisms by which this treatment reduces inflammation. Beyond effects on local immune responses, anti-TNF treatment may also modulate local hormone supply. Since androgens such as DHEA are thought to inhibit immune responses, their presence in inflamed tissue is an additionally important antiinflammatory factor.

Methods. In this study, we investigated conversion of the ubiquitous DHEA sulfate (DHEAS, the biologically inactive precursor of DHEA) to the androgen DHEA in mixed synovial cells of patients with RA and osteoarthritis (OA) making use of thin layer chromatography and phosphorimaging. By immunohistochemistry we detected the respective key enzyme, the steroid sulfatase.

Results. We observed a significantly lower DHEAS to DHEA conversion in synovial cells of RA patients as compared to OA patients (3.3 ± 0.5 vs 6.0 ± 0.9 % of applied [^3H]DHEAS per 10^6 synovial cells, $p = 0.042$). In RA but not in OA, converted [^3H]DHEA inversely correlated with synovial density of macrophages ($R_{\text{Rank}} = -0.725$, $n=13$, $p=0.005$, vs. $R_{\text{Rank}} = 0.069$, $n=18$, n.s.) and T cells ($R_{\text{Rank}} = -0.621$, $n=13$, $p=0.024$, vs. $R_{\text{Rank}} = 0.117$, $n=18$, n.s.). Double immunohistochemistry revealed that the steroid sulfatase was mainly located in synovial macrophages but was also found in fibroblasts. Neutralization of TNF largely up-regulated DHEAS to DHEA conversion in RA ($p<0.05$) but not in OA. A similar neutralizing effect was observed with polyclonal human immunoglobulins which is most probably mediated via TNF neutralization at low TNF concentrations ($p<0.01$).

Conclusions. These data indicate that TNF inhibits DHEAS to DHEA conversion in RA synovial cells. Since androgens are antiinflammatory mediators, TNF-induced inhibition of the local androgen supply is a supplementary proinflammatory factor. Consequently, anti-TNF strategies may also exert their positive effects by an increase of tissue androgens.

(Introduction)

Tumor necrosis factor (TNF) is an important stimulus of local inflammation and its neutralization is a fast acting treatment option in patients with rheumatoid arthritis (RA) (1) and other diseases (2, 3). TNF may also modulate local availability of steroid hormones because it has been demonstrated that this cytokine interferes with typical steroid converting enzymes in normal endocrine tissue (4-6). In this respect, the biologically inactive dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) is an important steroid hormone precursor for local androgens and estrogens (7). Particularly, after gradual involution of endocrine tissue, adrenal DHEAS supply is of outstanding importance for local tissue supply of the biologically active downstream dehydroepiandrosterone (DHEA) (8). After a decade of extensive work on the role of androgens on immune responses, these hormones are thought to play a critical antiinflammatory role in human rheumatic diseases (9-15) but also in animal models of arthritis and systemic lupus erythematosus (16, 17).

Tissue supply with DHEAS, which is locally converted to biologically active DHEA, is a critical factor for the further downstream conversion to testosterone and 17 β -estradiol (Fig. 1). Thus, DHEAS desulfatation by the X-chromosomally located microsomal steroid sulfatase (18), is the key enzyme step for DHEA tissue supply. Important work in macrophages of normal mice demonstrated that proinflammatory mediators such as lipopolysaccharide and TNF inhibit this enzyme step (19). However, cytokine-modulated conversion of DHEAS to DHEA has never been investigated in cells of inflamed tissue of patients with chronic inflammatory diseases.

It was the aim of this present study to investigate the role of TNF on DHEAS to DHEA conversion in mixed synovial cells of patients with RA and patients with osteoarthritis (OA). This study should give an idea as to how the ubiquitous precursor hormone DHEAS is locally converted to DHEA, the important precursor of testosterone and estrogens.

PATIENTS AND METHODS

Patients. In this study, 15 patients with long-standing RA fulfilling the American College of Rheumatology criteria for RA (20) and 22 patients with OA were included. These patients underwent elective knee joint replacement surgery, and they were informed about the purpose of the study and gave written consent. The study was approved by the Ethical Committee of the University of Regensburg. Basic clinical

and laboratory data are given in table 1. Parameters such as erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, and rheumatoid factor were measured by standard techniques.

Synovial tissue preparation. Synovial tissue samples were obtained immediately after opening the knee joint capsule. The preparation of the tissue for histology was described (21). Briefly, a piece of synovial tissue of up to 9 cm² was dissected. Fat tissue and tissue with a large number of blood vessels were removed. Six pieces of about 16 mm² were loaded into 8 superfusion chambers (see below), and approximately 8 pieces (0.8 cm²) of the same synovial area were used for histology. Samples intended for hematoxylin–eosin (HE) staining and alkaline phosphatase – anti-alkaline phosphatase (APAAP) staining were immediately placed in protective freezing medium (Tissue Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, The Netherlands) and then quick-frozen floating on liquid nitrogen. Tissue samples for the detection of nerve fibers were fixed for 12 to 24 hr in phosphate buffered saline (PBS) containing 3.7% formaldehyde and then incubated in PBS with 20% sucrose for 12 - 24 hr. Thereafter, tissue was embedded in Tissue Tek and quick-frozen. All tissue samples were stored at -80°C.

Histological evaluation and determination of synovial innervation. Histological evaluation was carried out as described previously (22). Briefly, the frozen tissue samples were cut into 6-8 µm thick sections and cell density and lining layer thickness were determined using standard HE staining of about 45 sections from at least 3 different tissue samples per patient. The overall cell density was determined by counting all stained cell nuclei in 17 randomly selected high power fields of view (400x) and expressed per square millimeter. The lining layer thickness was analyzed by averaging the number of cells in a lining layer cross section at 9 different locations at 400x magnification. To determine the number of T-cells (CD3, Dako, Hamburg, Germany), macrophages (CD163, Dako), and vessels (collagen IV, Dako) in the synovial tissue of each patient, 8 cryosections were investigated using APAAP staining and the number of identified structures was averaged from 17 randomly selected high power fields of view (400x) and expressed per square millimeter. The number of investigated high power fields was derived from a pioneering histological study of Bresnihan et al. (23).

The determination of synovial innervation has been described previously (22). Briefly, 6 to 8 cryosections (7 – 9 µm thick) of the formaldehyde / sucrose – fixed tissue samples were used for immunohistochemistry with a primary antibody against tyrosine hydroxylase (TH, the key enzyme for NE production in sympathetic nerve endings, Chemicon, Temecula, CA, USA). An Alexa 546 conjugated secondary antibody (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) was used to achieve immunofluorescent staining of

sympathetic nerve fibers. The numbers of TH-positive nerve fibers and cells per square millimeter were determined by averaging the number of stained nerve fibers (minimum length 50 μm , determined through a micrometer eyepiece) in 17 randomly selected high power fields of view (400x).

Immunohistochemistry of the steroid sulfatase. Human steroid sulfatase was detected using a specific rabbit antiserum against the protein previously published (24), and sections were double stained using immunofluorescence. Briefly, cryosections of acetone-fixed synovial tissue samples were air-dried for 1 hr and then rehydrated in 0.05 M TBS. Unspecific binding sites were blocked with 0.05 M TBS containing 10% fetal calf serum, 10% bovine serum albumin and 10% normal goat serum for 1 hr at room temperature. After a 10 min wash with TBS, the sections were incubated with the polyclonal anti-steroid sulfatase antibodies for 12 to 18 hr at room temperature together with a monoclonal antibody against activated macrophages (CD163, Dako) or fibroblasts (prolyl-4-hydroxylase, Dako). After three washes, staining of the positive cells was achieved by incubating the sections with respective secondary Alexa Fluor 488 and 555 F(ab')₂ fragments (Molecular Probes, Eugene, Oregon, U.S.A.). Nuclei were stained with Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, California, U.S.A.). Control staining with non-immune rabbit and mouse serum was carried out in parallel.

Steroid hormone conversion assay. Mixed synovial cells were isolated by enzymatic digestion of fresh synovial tissue for 1-2 hr at 37°C (Dispase Grade II, Roche Biochemicals, Mannheim, Germany). The synovial cells were re-suspended in serum-free RPMI 1640 medium (Sigma, Taufkirchen, Germany), supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies Inc., Paisley, U.K.), 0.1% amphotericin B (Bristol-Myers Squibb, Munich, Germany) and 4 ml/l ciprofloxacin (Bayer, Leverkusen, Germany). A total of 35.000 cells were seeded into 48-well plates in a volume of 250 μl and cultured for 24 hr (primary early culture of mixed synovial cells without further selection) in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at a temperature of 37°C.

To measure the activity of the steroid sulfatase, [1,2,6,7-³H]DHEAS (PerkinElmer Life Sciences, Rotgau, Germany) was added to each dish to achieve a final concentration of 0.2 $\mu\text{mol/l}$ (normal serum concentration approx. 6 $\mu\text{mol/l}$, serum concentration in patients with RA: 1.2 $\mu\text{mol/l}$, ref. 25). In order to test modulation of DHEAS to DHEA conversion, we added anti-TNF monoclonal antibody (infliximab, Essex Pharma GmbH, Munich, Germany), polyclonal immunoglobulins (as a control to the Fab part of infliximab, IgG Gammonativ, Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Germany), and a biologically irrelevant Fc chimera with the mouse oncostatin M receptor β -chain (as a true control to the Fc part of infliximab, protein homology

to the human oncostatin M receptor β -chain < 50%, R&D Systems, Wiesbaden, Germany) to synovial cells. The substances were added to achieve a final concentration of 0.01 and 0.1 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The synovial cells were cultured with [1,2,6,7- ^3H]DHEAS for additional 24 hr in a humidified atmosphere with 5% CO_2 at a temperature of 37°C.

Thin layer chromatography (TLC) analysis. Steroids in the supernatant were extracted twice with ethyl acetate at pH 1.0. After centrifugation, the organic phase was removed and evaporated to dryness by a nitrogen stream. Dried extracts were dissolved in 50 μl 100% ethanol. Samples of 10 μl were then spotted on silica gel 60 F254 TLC aluminum sheets (Merck, Darmstadt, Germany). A mixture of unlabeled carrier steroids (DHEAS, DHEA, androstenediol, testosterone, estrone, all from Sigma, Taufkirchen, Germany) were also spotted on each sheet in order to control chromatography later by UV illumination. The silica gel aluminum sheets were then developed in one dimension with the solvent system chloroform:diethylether (1:1). After developing, aluminum sheets were marked with [1,2,6,7- ^3H]DHEAS at 1 μM , 0.1 μM , 0.01 μM in order to produce a standard curve on every aluminum sheet (Fig. 2). Establishing a standard curve on every TLC sheet allows the exact determination of molar amounts of converted [^3H]DHEA. Then the sheets were exposed to tritium storage phosphor screens (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) for 18 - 24 hr. For the measurement of the activated screens we used the PhosphorImager SI (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). Spontaneous [^3H]DHEA generation from [^3H]DHEAS and background radioactivity were subtracted from each radioactivity spot (Fig. 2). TLC spots were assigned to steroid hormones by co-migration with authentic standards in the solvent system and visualized by heating to 130°C after dipping plates into 3% copper(II)-acetate in 8% phosphoric acid.

Superfusion technique of synovial tissue samples. In order to use an additional soluble readout parameter of synovial inflammation, IL-6 was detected in the superfusate of synovial tissue samples. The superfusion technique has been described previously in detail for spleen slices (26). Briefly, six pieces of synovial tissue samples were placed in superfusion chambers with 80 μl volume and then superfused with serum-free culture medium (RPMI 1640, 25 mM HEPES, 1% penicillin/streptomycin, 30 μM mercaptoethanol, 0.57 mM ascorbic acid, 1.3 mM calcium, all additions from Sigma, Taufkirchen, Germany). Superfusion was performed for 2 hr at 37°C using a flow rate of 66 $\mu\text{l/min}$ (one sample per chamber, six

chambers in parallel). Superfusate was collected at 2 hr and stored at -20°C for later bulk analysis of IL-6 by ELISA (Endogen via Perbio Science, Bonn, Germany).

Measurement of TNF in the synovial cell supernatant. An aliquot of isolated synovial cells of each patient was also incubated for 48 hr in supplemented RPMI 1640 without adding any substances. The TNF concentrations of these supernatants were measured by a high sensitive ELISA (R&D Systems, Wiesbaden, Germany).

L929 cell bioassay for detection of TNF effects. This assay was established in order to detect the possible TNF-neutralizing activity of IgG Gammonativ (see Results). L929 murine fibrosarcoma cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma, Taufkirchen, Germany), 1% penicillium/streptomycin (Life Technologies Inc., Paisley, U.K.) and 3×10^{-5} mol/l 2-mercaptoethanol (Sigma, Taufkirchen, Germany). The bioassays were carried out in supplemented RPMI 1640 under serum-free conditions. A total of 3×10^5 cells per well were seeded into a 96 well plate in supplemented medium containing 4 $\mu\text{g/ml}$ actinomycin D (Sigma, Taufkirchen, Germany). Then IgG Gammonativ and infliximab were added in the same concentrations as mentioned above together with different concentrations of TNF (39, 156, and 625 pg/ml , recombinant human protein from R&D Systems, Wiesbaden, Germany). After 24 hr in a humidified atmosphere with 5% CO_2 at a temperature of 37°C , the viability of the cells was measured by a colorimetric method using a standard protocol of the CellTiter 96[®] AQueous Assay (Promega Corporation, Madison, U.S.A.). The percentage of cell survival was calculated as follows: $(\text{Absorption}_{\text{treated cells}} / \text{Absorption}_{\text{untreated cells}}) \times 100$.

Presentation of data and statistical analysis. All data are given as means \pm SEM. Groups were compared by the non-parametric Mann-Whitney test, correlations were calculated by Spearman rank correlation analysis (SPSS / PC, V.11.5, SPSS Inc., Chicago, USA). $p < 0.05$ was the level of significance.

RESULTS

Markers of inflammation in synovial tissue. In order to delineate severity of local tissue inflammation, we investigated lining layer thickness, overall cellularity, density of CD3^+ T cells, CD163^+ macrophages, vascularity, and density of sympathetic nerve fibers which is an excellent marker of synovial in-

flammation (22). Obviously, patients with RA had more severe inflammation as compared to patients with OA (Table 1, Table 2).

DHEAS to DHEA conversion in synovial cells of RA and OA. Figure 3 demonstrates that DHEA generation from DHEAS was significantly lower in patients with RA as compared to OA. OA patients produced twice as much DHEA from the biologically inactive precursor DHEAS (Fig.3A). Under these conditions with one million synovial cells, produced DHEA is approximately 5 % of the initially administered DHEAS which reflects a conversion rate of 1:20 (Fig. 3A). Since steroid sulfatase located in synovial cells is responsible for DHEAS to DHEA conversion, we calculated the ratio of converted DHEA divided by overall cellularity (Fig. 3B). This ratio supported our above mentioned findings of low DHEAS to DHEA conversion in RA as compared to OA.

DHEAS to DHEA conversion and markers of inflammation. In order to link the amount of converted DHEA with typical markers of inflammation, Spearman correlation analysis was carried out. Obviously, there was a negative correlation between converted DHEA and density of T cells in patients with RA but not in OA (Fig. 4A,B). An even more clear picture appeared for the correlation between converted DHEA and macrophage density (Fig. 4C,D). Both tissue markers of inflammation were negatively linked to the amount of generated DHEA in patients with RA but not in OA. Similarly, superfusate concentration of IL-6 was negatively correlated to produced DHEA in RA but not in OA ($R_{\text{Rank}} = -0.588$, $n=13$, $p=0.035$, vs. $R_{\text{Rank}} = 0.181$, $n=18$, n.s.). Superfusate TNF was not investigated because it is not measurable in half of the patients. From these experiments, it seems to be obvious that increased inflammation is linked to lower amounts of converted DHEA. Interestingly, there was interrelation between medication such as prednisolone, methotrexate, sulfasalazine, leflunomide, chloroquine / hydroxychloroquine, azathioprine, cyclosporin A, COX2 inhibitors, or NSAID (unspecific COX1/2 inhibitors) and the amount of converted DHEA (data not shown). However, statistical power for this comparison was low due to low numbers of patients with respective drugs.

Double immunohistochemistry of the steroid sulfatase. Our above mentioned functional studies demonstrated steroid sulfatase activity in synovial cells of RA and OA. Immunohistochemical studies were carried out in order to detect the responsible sulfatase in the tissue. It is obvious that in OA and RA macrophages and fibroblast were positive for the steroid sulfatase (Fig. 5). Steroid sulfatase was mainly found in the sublining area (data not shown).

TNF and immunoglobulin G inhibit DHEAS to DHEA conversion in patients with RA. Since the inflammatory milieu seems to down-regulate DHEAS to DHEA conversion, TNF may be an excellent candidate to cause these effects (19). Indeed, the anti-TNF antibody infliximab enhanced DHEAS to DHEA conversion in mixed synovial cells of patients with RA but not in patients with OA (Fig. 6A,B). The use of polyclonal IgG as control to the Fab part of infliximab also demonstrated markedly enhanced DHEAS to DHEA conversion in mixed synovial cells of patients with RA but not in patients with OA (Fig. 6C,D). It seems likely that either Fc gamma receptors instigate this effect or that polyclonal IgG have TNF-neutralizing capacity. Both possibilities were tested in further experiments.

In order to delineate the role of Fc gamma receptors, we used a Fab - irrelevant protein, the Fc chimera / murine oncostatin M receptor β chain (homology to the human protein < 50%). Experiments with the Fc chimera did not reveal any effects in OA and RA patients which obviously rules out a direct effect via Fc gamma receptors (Fig. 7A,B). This may indicate that polyclonal IgG have got a TNF-neutralizing activity. TNF without addition of infliximab or IgG typically reduced viability of L929 cells (Fig. 7C, white bars). At all investigated concentrations of TNF, infliximab was able to completely abolish the TNF effect on these TNF - sensitive cells (Fig. 7C, black bars). Interestingly, polyclonal IgG also abolished the TNF effect at TNF concentrations of 39 pg/ml (Fig. 7C, cross-hatched bars). At higher concentrations of TNF, polyclonal IgG did not neutralize TNF effects (Fig. 7C, cross-hatched bars). This prompted us to investigate the supernatant concentration of incubated mixed synovial cells in RA and OA (3.5 ± 1.9 vs. 7.1 ± 3.8 pg/ml, n.s., $p=0.418$). This indicates that TNF concentrations were in the respective range in which neutralization of TNF by IgG is possible.

DISCUSSION

Adrenal androgens, precursors of testosterone and estrogens in tissue, are dramatically decreased in the systemic circulation of patients with rheumatic diseases (25, 27-34). Recent investigations even demonstrated that patients with low serum levels of DHEAS many years prior to the onset of RA were more likely to develop RA as compared to subjects with normal levels (35). In addition, androgens, the first products of DHEAS conversion in the tissue, have an antiinflammatory role in human rheumatic diseases (9-15) but also in animal models of arthritis and systemic lupus erythematosus (16, 17). At this point, we may summarize that low serum levels of DHEAS may be disadvantageous in chronic inflammatory dis-

eases due to a deficiency of this hormone and downstream androgens in inflamed tissue. However, it was not known how much of still available DHEAS can be converted to the androgen precursor DHEA in synovial cells of affected patients.

In this study, we demonstrate for the first time that DHEAS to DHEA conversion is decreased in patients with RA as compared to OA. Under consideration of low levels of serum DHEAS in patients with RA, this additional information demonstrates the full picture of local androgen deficiency in this disease. A likely factor which may influence this important conversion step is TNF because it has been demonstrated in macrophages of normal mice that TNF inhibits activity or expression of the microsomal steroid sulfatase, the key enzyme for DHEA generation in the tissue (19). In this present study, we were fortunate to demonstrate that TNF is also a strong inhibitor of DHEAS to DHEA conversion in synovial cells of RA patients but absolutely not in OA patients. Use of the Fab control of infliximab, polyclonal IgG, revealed a very similar increasing influence on this conversion step only in RA patients. Further experiments revealed that the positive effect of polyclonal IgG is most probably due to TNF neutralization at low TNF concentrations. It is not known whether, or not, TNF neutralization by polyclonal IgG is a likely factor for the positive effects of this therapy in rheumatic diseases. At least in our preparation the TNF neutralization is rather probable due to the low concentration of TNF in synovial cell cultures.

Interestingly, immunohistochemical double staining revealed that the steroid sulfatase was located in macrophages and to a smaller extent also in fibroblasts. This corroborates the idea that macrophages are mainly responsible for conversion of DHEAS to DHEA which was studied in murine macrophages (19). Double immunohistochemistry further demonstrates that many different cells are capable of converting DHEAS to DHEA. Since patients with RA demonstrated somewhat more macrophages per square millimeter tissue, one must assume that the activity of this particular enzyme is inhibited. As demonstrated in this study in RA and OA synovial cells, particularly TNF will be a strong inhibitor.

In conclusion, DHEAS to DHEA conversion is reduced in synovial cells of RA patients in comparison to OA, and TNF plays a critical inhibitory role. These findings in synovial cells extend our knowledge of androgen deficiency in systemic circulation. Both factors, local and systemic, together with the increased local activity of the aromatase in RA tissue (36), which converts androgens to estrogens (Fig. 1), leads to a severe androgen deficit in inflamed RA tissue. The balance of androgens versus estrogens is severely shifted to estrogens which most likely supports continuous inflammation in RA synovial tissue.

References

1. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 1993;36:1681-90.
2. van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, et al. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995;109:129-35.
3. Braun J, Brandt J, Listing J, Zink A, Alten R, Golder W, et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet* 2002;359:1187-93.
4. Jäättelä M, Ilvesmaki V, Voutilainen R, Stenman UH, Saksela E. Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin- induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology* 1991;128:623-9.
5. Xiong Y, Hales DB. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 on 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-->delta 4 isomerase expression in mouse Leydig cells. *Endocrine* 1997;7:295-301.
6. Adashi EY, Resnick CE, Croft CS, Payne DW. Tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin hormonal action in nontransformed ovarian granulosa cells. A modulatory noncytotoxic property. *J Biol Chem* 1989;264:11591-7.
7. Labrie F. Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 1991;78:C113-C118.
8. Greenspan FS, Gardner DG. Basic and clinical endocrinology. New York: Lange Medical-Books/McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2004.
9. Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Intra E, Accardo S. Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991;34:1-5.
10. Li ZG, Danis VA, Brooks PM. Effect of gonadal steroids on the production of IL-1 and IL-6 by blood mononuclear cells in vitro. *Clin Exp Rheumatol* 1993;11:157-62.
11. Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Barone A, Sulli A, Coviello DA, et al. Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:820-7.
12. Booji A, Biewenga-Booji CM, Huber-Bruning O, Cornelis C, Jacobs JW, Bijlsma JW. Androgens as adjuvant treatment in postmenopausal female patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996;55:811-5.
13. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 1996;106:410-5.

14. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1703-11.
15. Cutolo M, Wilder R. Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 2000;26:825-39.
16. Harbuz MS, Perveen-Gill Z, Lightman SL, Jessop DS. A protective role for testosterone in adjuvant-induced arthritis. *Br J Rheumatol* 1995;34:1117-22.
17. Carlsten H, Holmdahl R, Tarkowski A, Nilsson LA. Oestradiol- and testosterone-mediated effects on the immune system in normal and autoimmune mice are genetically linked and inherited as dominant traits. *Immunology* 1989;68:209-14.
18. Yen PH, Allen E, Marsh B, Mohandas T, Wang N, Taggart RT, et al. Cloning and expression of steroid sulfatase cDNA and the frequent occurrence of deletions in STS deficiency: implications for X-Y interchange. *Cell* 1987;49:443-54.
19. Hennebold JD, Daynes RA. Regulation of macrophage dehydroepiandrosterone sulfate metabolism by inflammatory cytokines. *Endocrinology* 1994;135:67-75.
20. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
21. Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Grifka J, Schölmerich J, et al. The prevalence of Sema-phorine 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, is increased in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, in press.
22. Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 2000;14:2097-107.
23. Bresnihan B, Cunnane G, Youssef P, Yanni G, Fitzgerald O, Mulherin D. Microscopic measurement of synovial membrane inflammation in rheumatoid arthritis: proposals for the evaluation of tissue samples by quantitative analysis. *Br J Rheumatol* 1998;37:636-42.
24. Dibbelt L, Herzog V, Kuss E. Human placental steryl sulfatase: immunocytochemical and biochemical localization. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1989;370:1093-102.
25. Vogl D, Falk W, Dorner M, Schölmerich J, Straub RH. Serum levels of pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: relation to other adrenal hormones. *J Rheumatol* 2003;30:269-75.
26. Straub RH, Herrmann M, Berkmler G, Frauenholz T, Lang B, Schölmerich J, et al. Neuronal regulation of interleukin 6 secretion in murine spleen: Adrenergic and opioidergic control. *J Neurochem* 1997;68:1633-9.

27. Feher KG, Feher T. Plasma dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulphate and androsterone sulphate levels and their interaction with plasma proteins in rheumatoid arthritis. *Exp Clin Endocrinol* 1984;84:197-202.
28. Masi AT, Josipovic DB, Jefferson WE. Low adrenal androgenic-anabolic steroids in women with rheumatoid arthritis (RA): gas-liquid chromatographic studies of RA patients and matched normal control women indicating decreased 11-deoxy-17-ketosteroid excretion. *Semin Arthritis Rheum* 1984;14:1-23.
29. Lahita RG, Bradlow HL, Ginzler E, Pang S, New M. Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1987;30:241-8.
30. Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Monachesi M, Accardo S. Sex hormone status of male patients with rheumatoid arthritis: evidence of low serum concentrations of testosterone at baseline and after human chorionic gonadotropin stimulation. *Arthritis Rheum* 1988;31:1314-7.
31. Sambrook PN, Eisman JA, Champion GD, Pocock NA. Sex hormone status and osteoporosis in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:973-8.
32. Deighton CM, Watson MJ, Walker DJ. Sex hormones in postmenopausal HLA-identical rheumatoid arthritis discordant sibling pairs. *J Rheumatol* 1992;19:1663-7.
33. Kanik KS, Chrousos GP, Schumacher HR, Crane ML, Yarboro CH, Wilder RL. Adrenocorticotropin, glucocorticoid, and androgen secretion in patients with new onset synovitis/rheumatoid arthritis: relations with indices of inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1461-6.
34. Straub RH, Glück T, Cutolo M, Georgi J, Helmke K, Schölmerich J, et al. The adrenal steroid status in relation to inflammatory cytokines (interleukin-6 and tumour necrosis factor) in polymyalgia rheumatica. *Rheumatology* 2000;39:624-31.
35. Masi AT. Hormonal and immunologic risk factors for the development of rheumatoid arthritis: an integrative physiopathogenetic perspective. *Rheum Dis Clin North Am* 2000;26:775-803.
36. Castagnetta LA, Carruba G, Granata OM, Stefano R, Miele M, Schmidt M, et al. Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30:2597-605.

Table 1 Basic characteristics of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis who underwent knee-joint replacement surgery. Data are given as means \pm S.E.M., percentages are given in parentheses.

	Osteoarthritis	Rheumatoid arthritis
Number of patients	22	15
Age (yr)	69.6 \pm 1.6	65.3 \pm 3.3
Gender m/f	2 / 20	0 / 15
Disease duration (yr)	n.a.	15.4 \pm 2.0
Erythrocyte sedimentation rate (mm 1 st hr)	16.2 \pm 2.4*	28.6 \pm 7.2
C-reactive protein (mg/l)	5.5 \pm 0.7**	28.6 \pm 7.2
Presence of rheumatoid factor	n.a.	14 (87.5)
Medication		
Prednisolone	0 (0)	10 (67.0)
Methotrexate	0 (0)	3 (20.0)
Sulfasalazine	0 (0)	1 (7.0)
Leflunomide	0 (0)	2 (13.3)
Chloroquine / hydroxychloroquine	0 (0)	2 (13.3)
Azathioprine	0 (0)	1 (7.0)
Cyclosporin A	0 (0)	0 (0)
COX2 inhibitors	2 (9.1)	1 (7.0)
NSAID (unspecific COX1/2 inhibitors)	13 (59.1)	13 (81.3)

*p < 0.02, **p<0.005 vs. patients with rheumatoid arthritis; n.a. not applicable. Abbreviations: COX, cyclo-oxygenase.

Table 2 Inflammatory markers in synovial tissue of patients with RA and OA. Data are given as means \pm S.E.M.

	Osteoarthritis	Rheumatoid arthritis
Lining layer thickness (number of cells)	1.7 \pm 0.1**	4.0 \pm 0.4
Overall cellularity (cells / mm ²)	1310 \pm 133*	2039 \pm 237
CD3 ⁺ T cell density (cells / mm ²)	27.7 \pm 6.4	73.3 \pm 27
CD163 ⁺ macrophages (cells / mm ²)	73.1 \pm 10.1	110.4 \pm 29.0
Vascularity (vessels / mm ²)	32.0 \pm 4.7	27.4 \pm 5.2
sympathetic nerve fibers (fibers / mm ²)	1.9 \pm 0.4**	0.5 \pm 0.2

*p < 0.02, **p \leq 0.005 vs. patients with rheumatoid arthritis.

Figure Legends

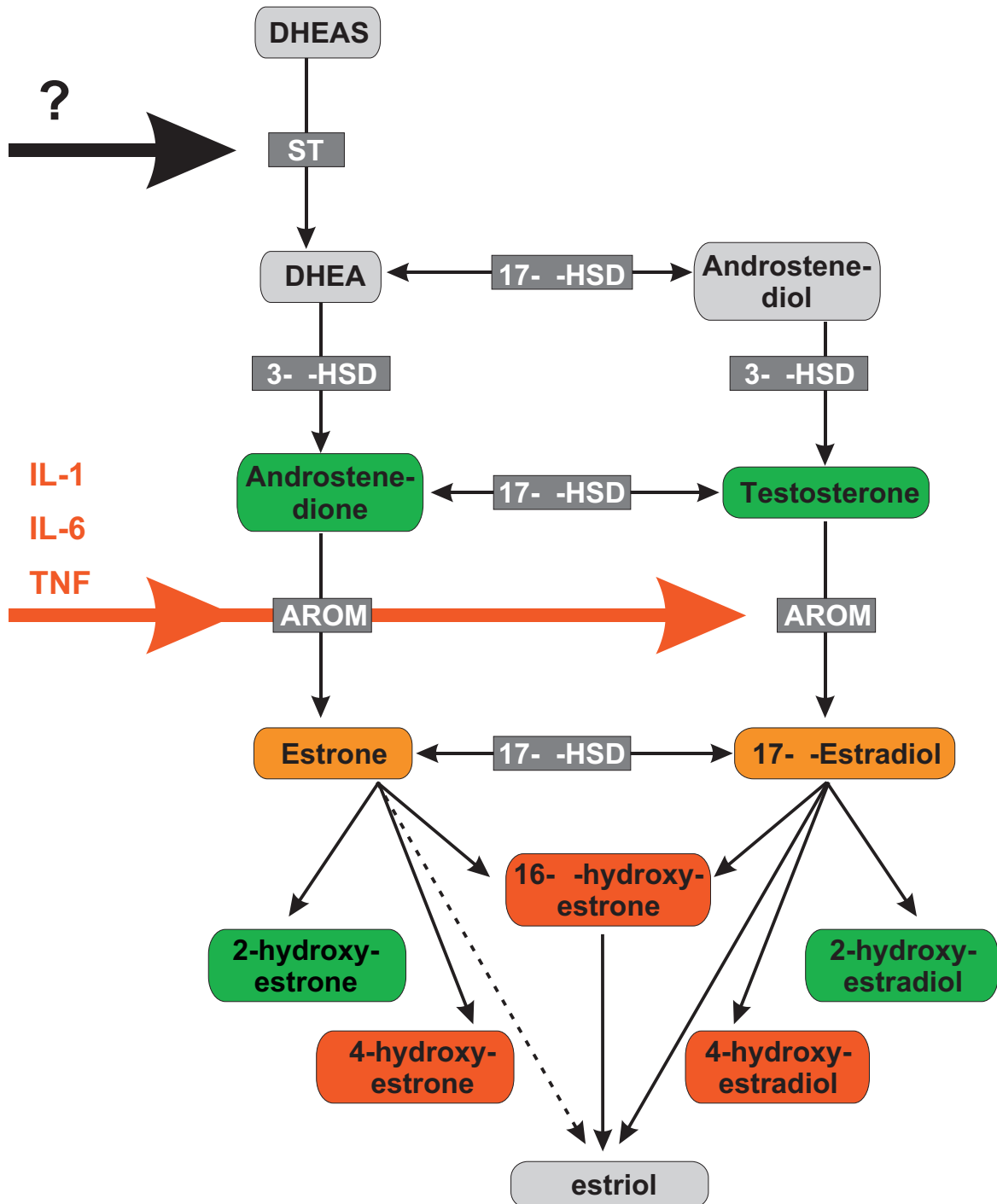
- Figure 1** Schematic diagram demonstrating the biosynthesis of tissue steroid hormones. The ultimate precursor of androgens in synovial tissue is biologically inactive DHEAS which is converted to the active DHEA by the steroid sulfatase (ST). DHEA itself can be converted to downstream androgens (androstenedione, testosterone) and estrogens (hormones below the AROM = aromatase enzyme). Steroid hormones in a green (red) area indicate supposed antiinflammatory (proinflammatory) activity. Cytokines such as IL-1, IL-6, and TNF stimulate the aromatase (red arrow). Abbreviations: DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEAS, DHEA sulfate; Enzymes: 3- β -HSD, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase; 17- β -HSD, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; ST, DHEAS sulfatase.
- Figure 2** Example of a thin layer chromatography. On the left side, it is demonstrated how [3 H]DHEAS is spontaneously converted to [3 H]DHEA under conditions without synovial cells. In the lower right corner, two samples of synovial cell supernatant of a patient with OA are given (two replicates). It is obvious that spontaneous conversion is minimal in comparison to conversion in the presence of synovial cells. Results of spontaneous conversion were subtracted from results of conversion in the presence of cells. In the upper right corner, the standard curve is delineated (10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M). This standard curve was blotted on every sheet in order to avoid differences between sheets.
- Figure 3** Amount of DHEAS to DHEA conversion in synovial cells of patients with osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA). A) The diagram gives converted [3 H]DHEA (*DHEA) in percent of applied [3 H]DHEAS (*DHEAS) per one million investigated synovial cells. B) This graph delineates the ratio of above mentioned *DHEA divided by overall cellularity (see also table 2). In all experiments, 0.2 μ mol/l *DHEAS was used in 18 patients with OA and 13 patients with RA, and assays were carried out in duplicate.
- Figure 4** Correlation analysis of inflammatory markers and converted DHEA in patients with osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA). Due to some missing histological evaluations in patients with OA and RA not all patients were included in these diagrams. The diagrams give the linear regression line, the Spearman rank correlation coefficient, and

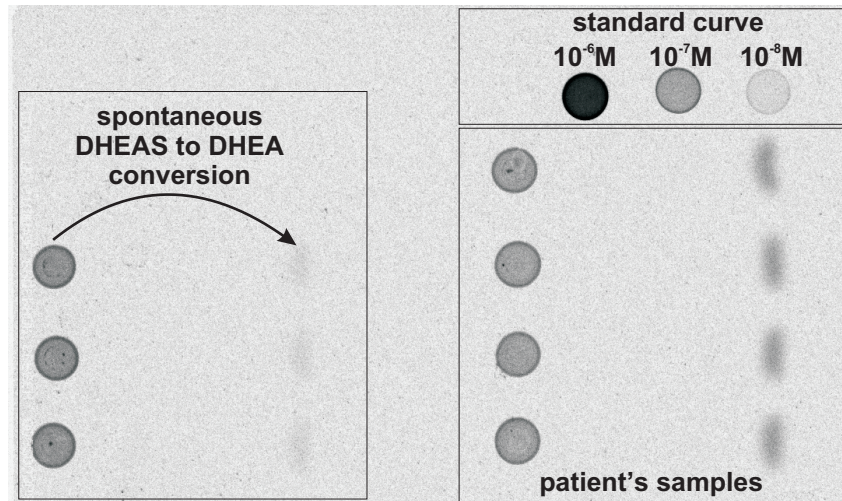
the respective p-value according to the number of patients. For these experiments, 0.2 $\mu\text{mol/l}$ *DHEAS was used.

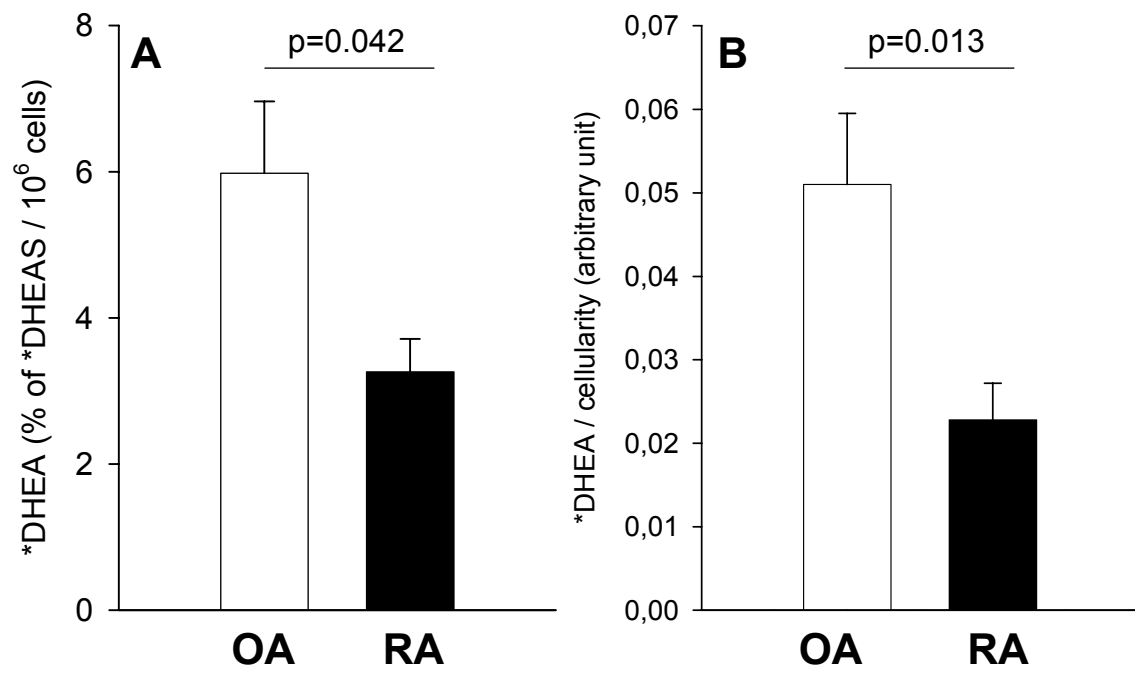
Figure 5 Double immunohistochemistry of steroid sulfatase in a patient with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Synovial cells from a patient with OA and RA stain positive for CD163⁺ macrophages (green fluorescence) and prolyl-4-hydroxylase – positive fibroblasts (green fluorescence) as well as steroid sulfatase (red fluorescence). The panels on the right side demonstrate the overlay with indicated double staining (white arrows). Micrographs were taken at 400x magnification.

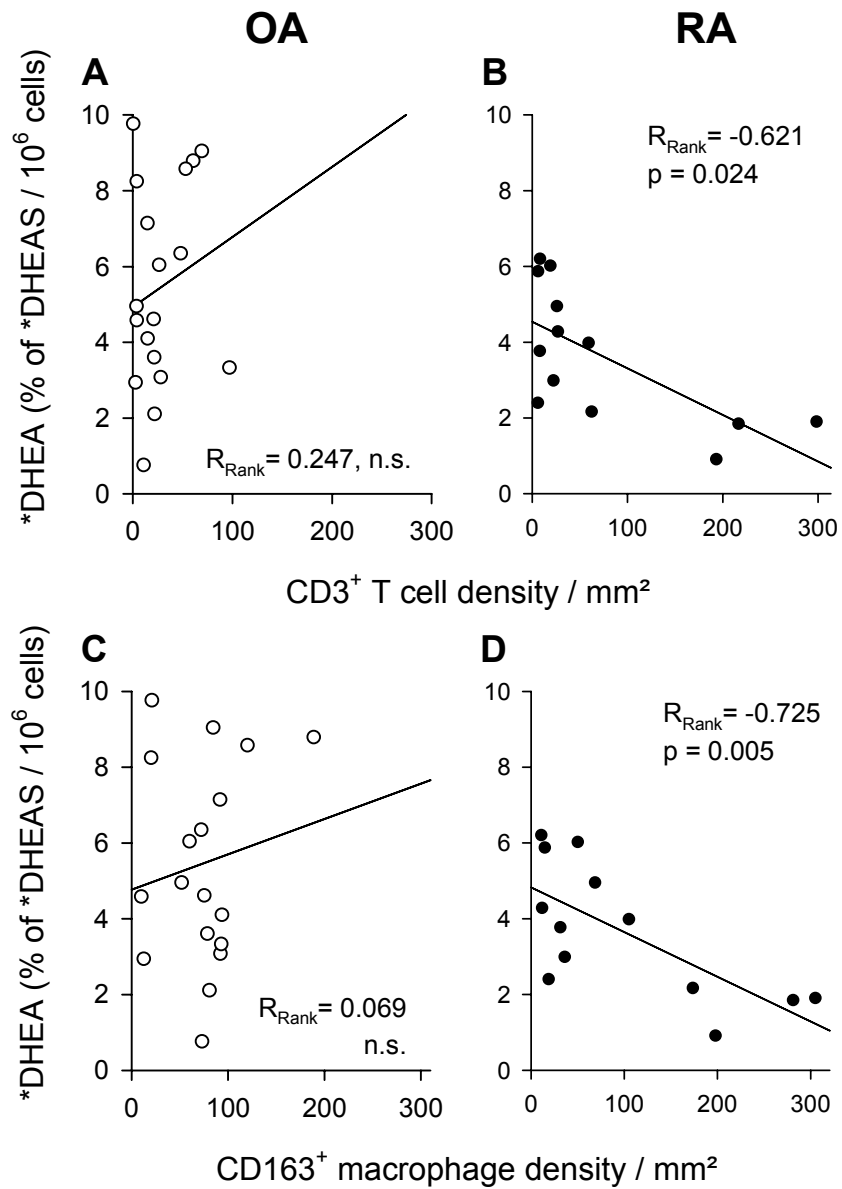
Figure 6 Modulation of DHEAS to DHEA conversion by infliximab and polyclonal IgG in patients with osteoarthritis (OA, panels A and C) and rheumatoid arthritis (RA, panels B and D). Conversion in at least four different patients was investigated. *p = 0.066, **p = 0.011, ⁺p = 0.003, and ⁺⁺p < 0.001 for the comparison of control (Co) versus indicated concentrations of infliximab (anti-TNF) and polyclonal IgG. In all experiments, 0.2 $\mu\text{mol/l}$ *DHEAS was used in at least 3 patients with OA and 3 patients with RA, and assays were carried out in duplicate.

Figure 7 Modulation of DHEAS to DHEA conversion by the Fc chimera / oncostatin M receptor β chain and results of the L929 TNF bioassay. A,B) In patients with osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA), the Fc chimera does not stimulate DHEAS to DHEA conversion. In all experiments, 0.2 $\mu\text{mol/l}$ *DHEAS was used, and steroid hormone conversion in at least three different patients was investigated. C) L929 TNF bioassay in order to detect the TNF-neutralizing capacity of infliximab and polyclonal IgG. In the L929 TNF bioassay, addition of TNF to L929 cells leads to fast cell death which is indicated by decreased absorbance in a colorimetric method. The data are given in percent of the control (Co = no TNF, no infliximab, no polyclonal IgG). White bars demonstrate controls without addition of infliximab or polyclonal IgG. Black (cross-hatched) bars demonstrate the TNF-neutralizing effects of infliximab (polyclonal IgG) at concentrations of 0.1 (.1) and 1.0 $\mu\text{g/ml}$. For each condition, four independent experiments with two replicates were carried out. *p = 0.052, **p = 0.010, and ⁺p < 0.005 for the comparison versus the respective control condition (white bar).

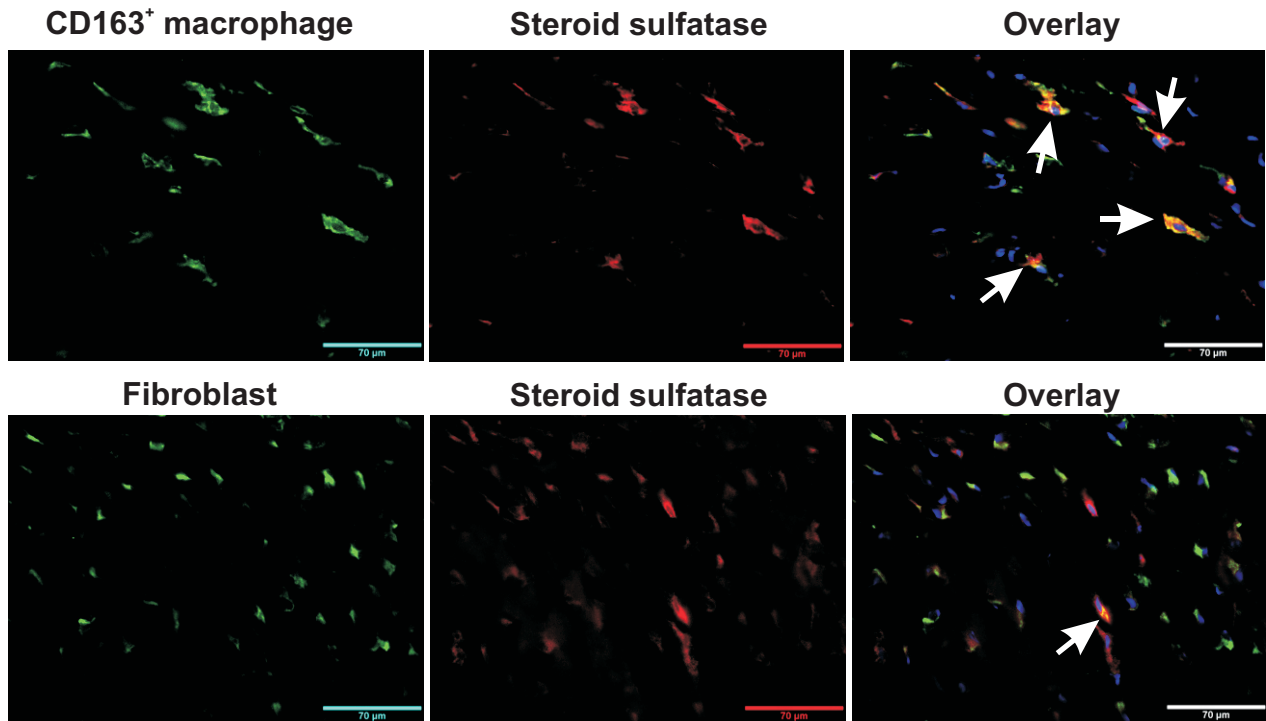




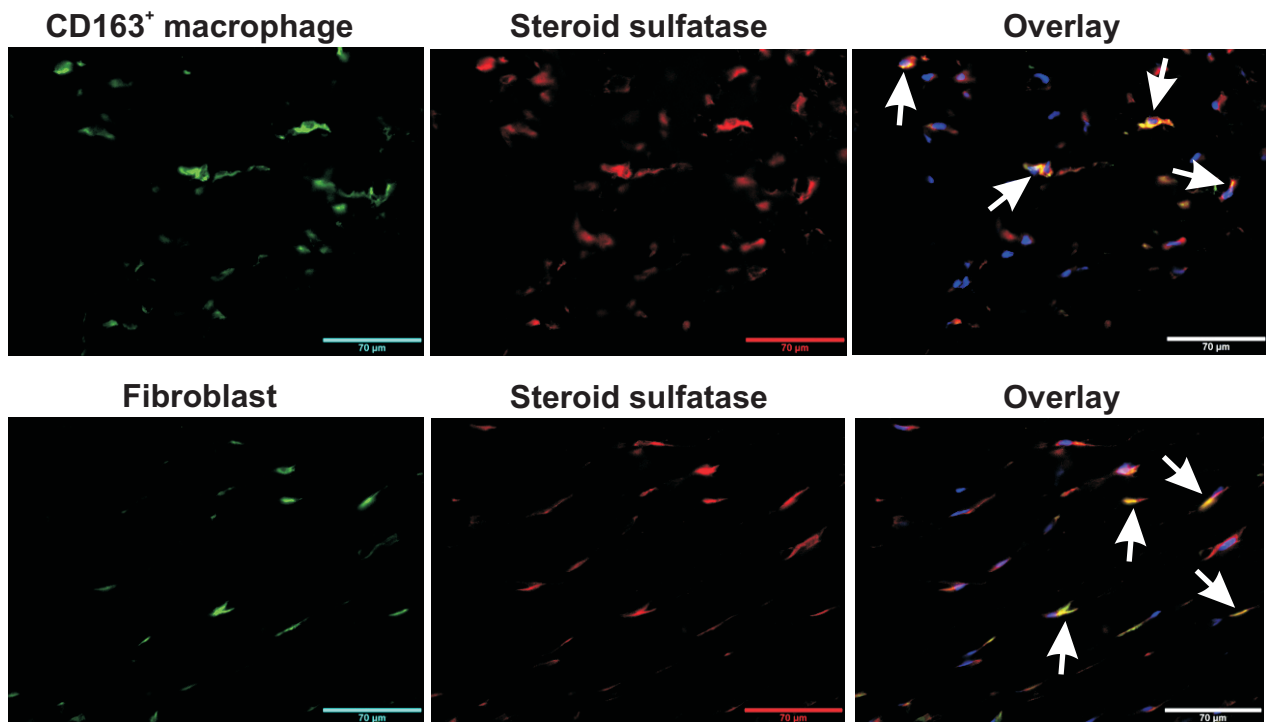


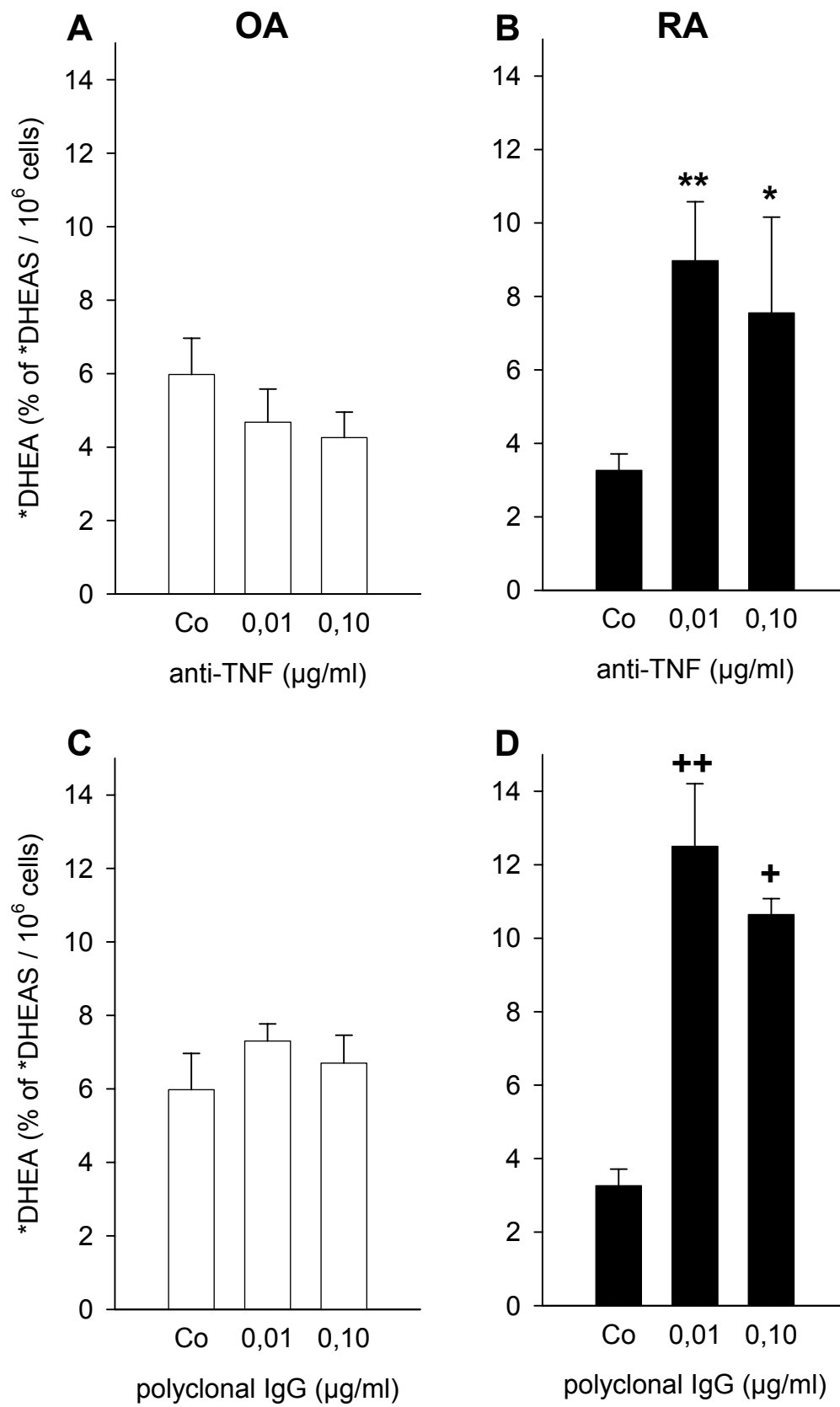


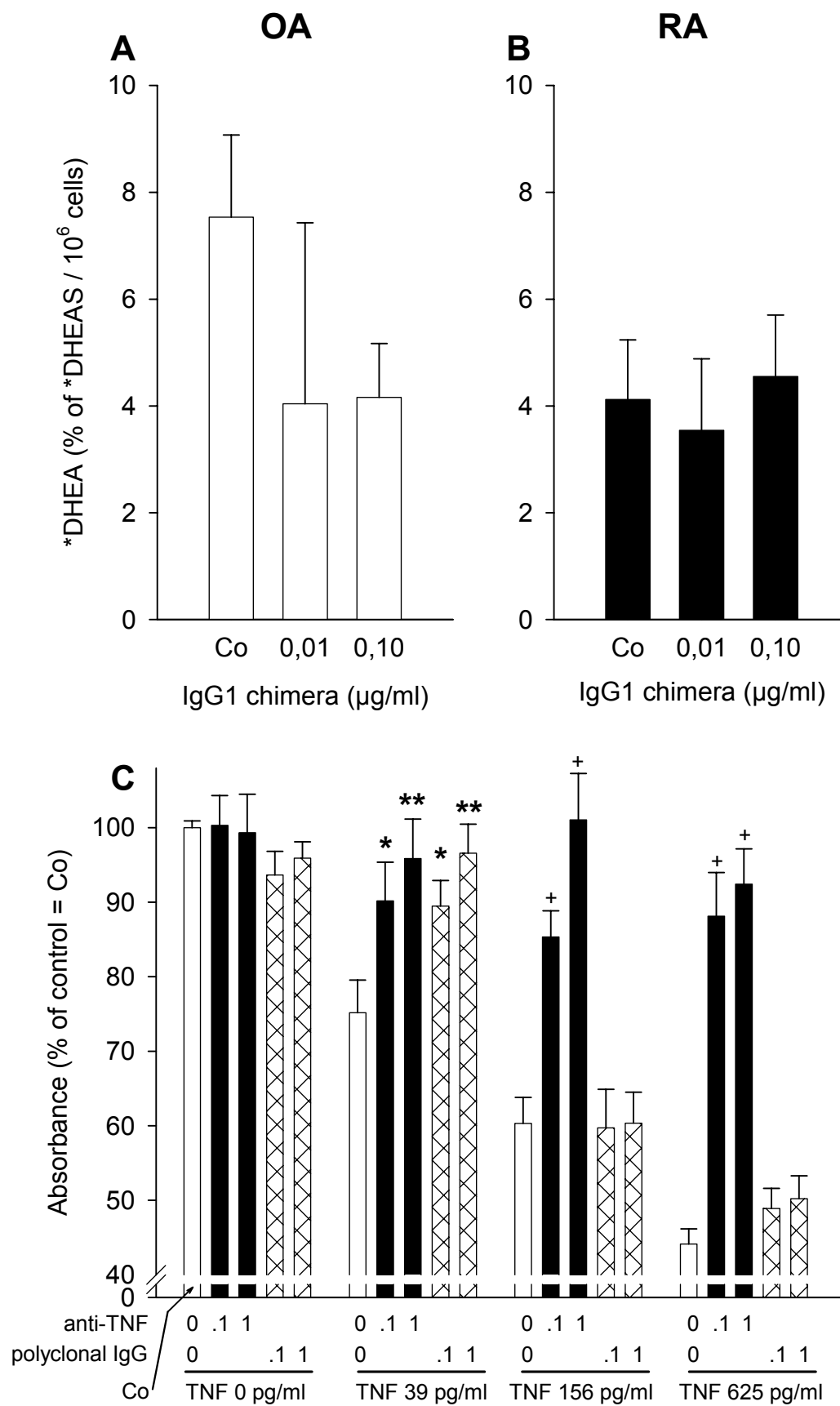
Osteoarthritis



Rheumatoid arthritis







Patients with Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus Have Increased Renal Excretion of Mitogenic Estrogens in Relation to Endogenous Antiestrogens

CLAUDIA WEIDLER, PETER HÄRLE, JOERG SCHEDEL, MARTIN SCHMIDT, JÜRGEN SCHÖLMERICH, and RAINER H. STRAUB

ABSTRACT. Objective. In patients with rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE), 17 β -estradiol was thought to play a dual pro- and antiinflammatory role depending on its concentration or probably conversion to downstream mitogenic 16 α -hydroxyestrone or naturally occurring antiestrogens such as 2-hydroxyestrone. We compared renal excretion of these 2 types of estrogens in healthy subjects and patients with RA and SLE.

Methods. In a prospective study with 30 patients with RA, 32 with SLE, and 54 healthy subjects, we measured urinary levels of 16 α -hydroxyestrone and 2-hydroxyestrogens by enzyme immunoassay. We studied renal excretion to estimate the time-integral of hormone production.

Results. Urinary concentration and total urinary loss of 2-hydroxyestrogens was 10 times higher in healthy subjects compared to patients with either SLE or RA irrespective of prior prednisolone treatment or sex. The urinary concentration and loss of 16 α -hydroxyestrone did not differ between healthy subjects and patients with RA/SLE. The ratio of urinary 16 α -hydroxyestrone/2-hydroxyestrogens was more than 20 times higher in RA and SLE than healthy subjects irrespective of prior glucocorticoid treatment or sex.

Conclusion. This study in RA and SLE patients clearly demonstrates a large shift to mitogenic estrogens in relation to endogenous antiestrogens. Both steroids are converted from the precursor 17 β -estradiol and estrone. In patients with RA and SLE, the magnitude of conversion to the mitogenic 16 α -hydroxyestrone is greatly upregulated, which likely contributes to maintenance of the proliferative state in these diseases. (J Rheumatol 2004;31:489–94)

Key Indexing Terms:

RHEUMATOID ARTHRITIS
16 α -HYDROXYESTRONE

ESTROGENS
2-HYDROXYESTRONE

SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS
2-HYDROXYESTRADIOL

In the late 1970s, Kunkel and colleagues made the important observation that estrogen metabolism is altered in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)^{1,2}. This group described elevated serum concentrations of 16 α -hydroxylated estrogens in patients with SLE. They concluded that women with SLE had abnormal patterns of estradiol metabolism that may lead to increased estrogenic activity¹. A

similar phenomenon was recently described for synovial fluid concentrations of this hormone in patients with rheumatoid arthritis (RA)³. This suggests that 16 α -hydroxylated estrone may play an important role in these diseases. This estrogen and others are converted from upstream estrone and 17 β -estradiol (Figure 1).

Interestingly, breast cancer research revealed a mitogenic tumor growth-stimulating role of 16 α -hydroxylated estrogens that indicates the potent estrogenic activity of these hormones⁴. These hormones bind to the estrogen receptor and thereby induce nuclear translocation of the hormone-receptor complex and subsequently growth of breast cancer cells *in vitro*⁵. Other conversion products of estrone and 17 β -estradiol are the 2-hydroxylated estrogens such as 2-hydroxyestrone and 2-hydroxyestradiol (Figure 1). In contrast to 16 α -hydroxylated estrogens, the 2-hydroxylated forms inhibit growth-promoting effects of 17 β -estradiol⁶. The anticarcinogenic effect of 2-hydroxyestrone has been extensively reviewed⁷. Further, the estrogen metabolism pathway favoring 2-hydroxylation over 16 α -hydroxylation is associated with a reduced risk of invasive breast cancer in

From the Department of Internal Medicine I, Laboratory of Neuroendocrinology, University Medical Center Regensburg; and the Department of Biochemistry II, University Hospital of Friedrich-Schiller University, Jena, Germany.

R.H. Straub and M. Schmidt are supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Str 511/10-1 and DFG Schm 1611/1-1).

C. Weidler, Graduate PhD Student; J. Schedel, Fellow of Rheumatology; P. Härle, Fellow of Rheumatology; J. Schölmerich, MD, Professor, Head of Department; R.H. Straub, MD, Professor of Experimental Medicine, Rheumatologist, Department of Internal Medicine I, University Medical Center Regensburg; M. Schmidt, PhD, Biochemistry II, University Hospital, Friedrich-Schiller-University Jena.

Address reprint requests to Dr. R.H. Straub, Department of Internal Medicine I, University Medical Center, D-93042 Regensburg, Germany. E-mail: rainer.straub@klinik.uni-regensburg.de

Submitted March 21, 2003; revision accepted August 28, 2003.

Table 1. Basic characteristics of patients with RA or SLE in the subgroup analyses. Data are given as means \pm SEM and percentages in parentheses.

	RA	SLE	Controls
Number	30		23
Age, yrs	56.1 \pm 2.4		51.5 \pm 0.8
Sex (f/m), n	22/8 (73/27)		12/11 (52/48)
Premenopausal women, n	3/22		1/12
Disease duration, yrs	10.8 \pm 1.9		NA
No. of swollen joints	4.1 \pm 1.5		NA
No. of painful joints	6.6 \pm 1.6		NA
ESR, mm/h	27.7 \pm 3.9		NM
Medication			
Prednisolone	20 (67)		NA
Prednisolone, mg/day	6.5 \pm 1.8		NA
Methotrexate	9 (41)		NA
NSAID	11 (38)		NA
Leflunomide	8 (27)		NA
Anti-TNF strategy	6 (21)		NA
Sulfasalazine	2 (7)		NA
Cyclophosphamide	0 (0)		NA
Azathioprine	0 (0)		NA
Number		32	42
Age, yrs		38.1 \pm 2.1	37.1 \pm 1.5
Sex (f/m), n		24/8 (75/25)	25/17 (60/40)
Premenopausal women		22/24	18/25
Disease duration, yrs		8.0 \pm 1.5	NA
SLEDAI (points)		10.1 \pm 1.5	NA
ESR, mm/h		25.0 \pm 3.3	NM
Medication			
Prednisolone		22 (69)	NA
Prednisolone, mg/day		9.4 \pm 3.4	NA
Methotrexate		2 (6)	NA
NSAID		13 (41)	NA
Leflunomide		0 (0)	NA
Anti-TNF strategy		NA	NA
Sulfasalazine		0 (0)	NA
Cyclophosphamide		2 (6)	NA
Azathioprine		12 (38)	NA

Anti-TNF strategies are either infliximab or etanercept. ESR: erythrocyte sedimentation rate; NA: not applicable; NM: not measured; NSAID: nonsteroidal antiinflammatory drugs; SLEDAI: SLE Disease Activity Index.

of 16 α -hydroxylated estrone between controls and patients of both disease groups (Figures 2C, 2D). Comparison of women and men with RA/SLE with their respective controls revealed very similar results (data not shown). Comparison of male versus female controls and also patients did not reveal a significant difference for urinary hormone concentrations of the 2 metabolites (data not shown).

Total urinary loss of 2- and 16 α -hydroxylated estrogens. A very similar picture to that for urinary concentrations was found for total urinary loss of these hormones in nmol per hour (Figure 3). Urine volume and collection time were included into the calculation of this measure, as: total loss = (concentration \times volume)/collection time. Again, patients in both disease groups irrespective of prior prednisolone treatment compared to controls showed a decreased loss of 2-hydroxylated estrogens (Figures 3A, 3B). In patients with RA, the molar amount of excreted 16 α -hydroxyestrone was

very similar to controls (Figure 3C). In SLE patients without prior prednisolone treatment, loss of 16 α -hydroxyestrone was significantly increased in relation to controls (Figure 3D). This did not reach significance level in all SLE patients including those with prednisolone pretreatment due to the high variation (Figure 3D). Comparison of women and men with RA/SLE to their respective controls revealed very similar results (data not shown). Comparison of male with female controls and also patients revealed no significant difference for both urinary hormone concentrations (data not shown).

Relation of 16 α -hydroxylated and 2-hydroxylated estrogens. To estimate the relative increase of 16 α -hydroxyestrone in relation to 2-hydroxylated estrogens a molar ratio of these 2 hormones was calculated using the numerical value of the urinary concentrations (an identical ratio is calculated when the total urinary loss in nmol/h is used; i.e., a unitless ratio).

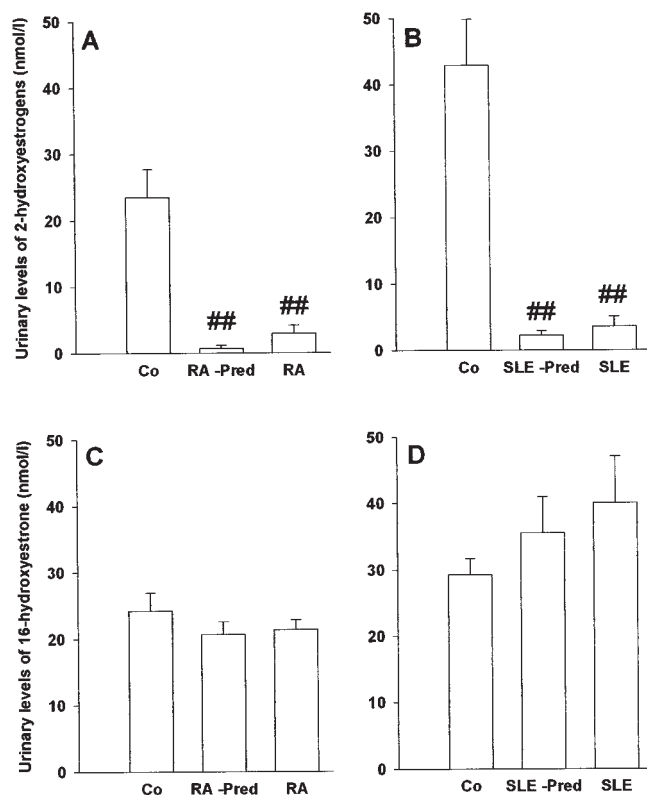


Figure 2. Urinary concentrations of 2-hydroxylated estrogens (A, B) and 16 α -hydroxyestrone (C, D) in patients with RA and SLE. Co: healthy controls; -Pred: no prior prednisolone therapy. ## $p < 0.001$ for comparison of the respective median with control. Data are given as mean nmol/l \pm SEM.

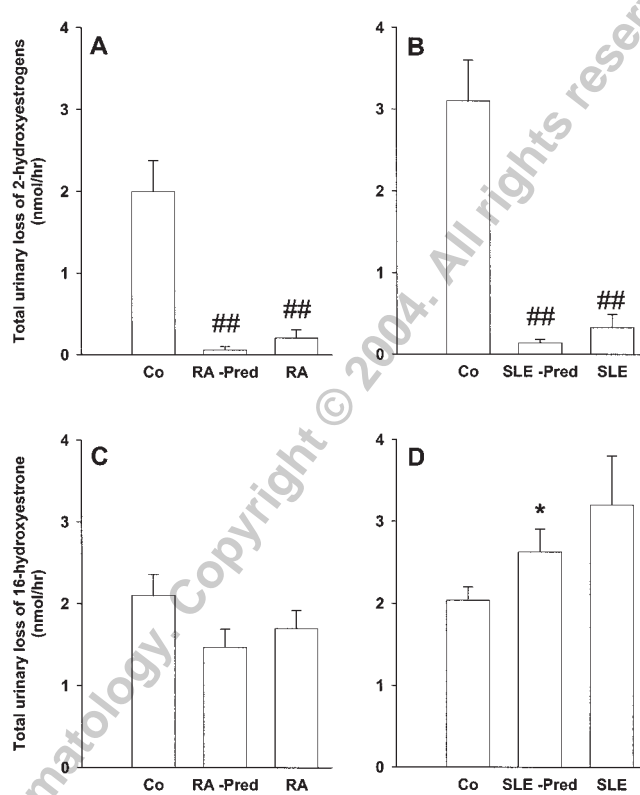


Figure 3. Total urinary loss of 2-hydroxylated estrogens (A, B) and 16 α -hydroxyestrone (C, D) in patients with RA and SLE. Co: healthy controls; -Pred: no prior prednisolone therapy. * $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ for comparison of the respective median with control. Data are given as mean nmol/h \pm SEM.

This ratio was elevated more than 20 times in both patient groups without prior prednisolone treatment, and it was even further enhanced in all patients of the 2 disease groups (Figure 4). Thus, the molar amount of excreted 16 α -hydroxyestrone is markedly elevated in relation to 2-hydroxylated estrogens. Comparison of women and men with RA/SLE with their respective controls yielded the same results (data not shown). Similar to the urinary hormone concentrations and total renal excretion, this phenomenon was not sex-dependent.

Disease activity and excreted 2- and 16 α -hydroxylated estrogens. In patients with RA, irrespective of prior prednisolone treatment, excretion of both estrogen metabolites was not related to the number of tender or swollen joints ($p \geq 0.10$). In all patients with SLE, the total molar amount of 2-hydroxylated estrogens per hour was negatively correlated with the SLEDAI ($R_{\text{Rank}} = -0.389$, $p = 0.045$), but no interrelation was observed for 16 α -hydroxyestrone ($p > 0.10$). In the smaller number of SLE patients without prior prednisolone treatment, this did not achieve significance ($p > 0.10$).

DISCUSSION

This study clearly demonstrates increased renal excretion of 16 α -hydroxyestrone in relation to 2-hydroxylated estrogens, which may be unfavorable. Considering recent studies^{8,15}, it is thought that urinary excretion of these hormones reflects production in the tissue because no respective hydroxylase activity is expected in the urine. We recently reported that patients with RA present significantly elevated concentrations of synovial 16 α -hydroxyestrone and 4-hydroxyestradiol compared to controls³. The synovial fluid levels of 2-hydroxyestrone were not significantly different between the 2 groups. Thus, local conversion of estrone and 17 β -estradiol are most likely the source of 16 α -hydroxyestrone and 2-hydroxylated estrogens. The conversion may be particularly upregulated in inflamed tissue³.

Studies in breast cancer research determined that 16 α -hydroxyestrone is a mitogenic and proliferative endogenous hormone that binds covalently to the estrogen receptor, leading to nuclear translocation^{4,5,9}. Because of this covalent linkage to the receptor, 16 α -hydroxyestrone shows persistent biological responses¹⁶. In proliferation assays, 16 α -

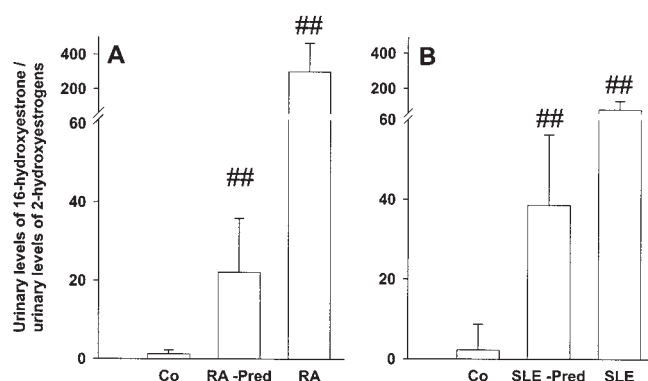


Figure 4. Molar ratio of 16 α -hydroxyestrone and 2-hydroxylated estrogens in patients with RA (panel A) and SLE (panel B). Co: healthy controls; -Pred: no prior prednisolone therapy. ##p < 0.001 for comparison of the respective median with control. Data are given as mean \pm SEM (without unit).

hydroxyestrone had an activity comparable to that observed for the carcinogen DMBA⁹. Measurement of anchorage-independent colony formation of mammary epithelial cells grown in soft agar showed that 16 α -hydroxyestrone was far more potent than 17 β -estradiol⁹. Thus, 16 α -hydroxyestrone may induce a hyperestrogenic state. This is particularly true if the naturally occurring antiestrogens, the 2-hydroxylated estrogens, are diminished. This is obviously the case in both patient groups in our study, which led to more than 20 times increased molar amounts of 16 α -hydroxyestrone in relation to 2-hydroxylated estrogens. In contrast to 16 α -hydroxylated estrogens, the 2-hydroxylated forms inhibit growth-promoting effects of 17 β -estradiol⁶. In this respect, 2-hydroxyestrone has anticarcinogenic properties and, thus it is most likely a naturally-occurring antiestrogen⁷. The relative loss of 2-hydroxylated estrogens in relation to 16 α -hydroxyestrone may thus be an important switch to support the chronic proliferative state in these diseases. This is corroborated by the observation that disease activity in patients with SLE was negatively correlated to urinary concentrations of 2-hydroxylated estrogens. One may speculate that the role of 17 β -estradiol, which was thought to play a dual pro- and antiinflammatory role in chronic inflammatory diseases depending on its local concentration^{17,18}, largely depends on conversion downstream to pro- or antiinflammatory metabolites such as 16 α -hydroxyestrone or naturally-occurring antagonists (2-hydroxylated forms of estrogens). Further, conversion to metabolites downstream may also determine the pro- and antiinflammatory role of estrogens during hormone replacement therapy. Since the excretion of 2-hydroxylated estrogens was very low in the 2 disease groups, we may expect an important shunt pathway for estrogens, and elucidation of this would be important to understand the entire phenomenon.

It is intriguing that sex and the ovulatory state did not influence our findings. This clearly indicates that the gonadal production of these hormones is not responsible for

the observed results. Thus, it seems that most of the measured metabolites are converted in the periphery, which is largely independent of sex. It is most probable that this mainly depends on the inflammatory state in the tissue³. Moreover, the hormone shift appears in both disease groups, which indicates that the phenomenon is not disease-specific. Similarly disease-nonspecific is the well known loss of adrenal androgens and the inadequately low serum levels of cortisol in relation to inflammation. It seems that these disease related changes are not evolutionarily conserved for a specific inflammatory disease. Most probably these inflammation-dependent reactions were evolutionarily conserved for other processes, which are used in a large number of inflammatory reactions. Discovery of the general rule behind these phenomena must be of great future interest.

REFERENCES

1. Lahita RG, Bradlow HL, Kunkel HG, Fishman J. Alterations of estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1979;22:1195-8.
2. Stern R, Fishman J, Brusman H, Kunkel HG. Systemic lupus erythematosus associated with Klinefelter's syndrome. *Arthritis Rheum* 1977;20:18-22.
3. Castagnetta LA, Carruba G, Granata OM, et al. Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30:2597-605.
4. Schneider J, Huh MM, Bradlow HL, Fishman J. Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1984;259:4840-5.
5. Swaneck GE, Fishman J. Covalent binding of the endogenous estrogen 16 alpha-hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: characterization and intranuclear localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7831-5.
6. Vandewalle B, Lefebvre J. Opposite effects of estrogen and catecholesteron on hormone-sensitive breast cancer cell growth and differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 1989;61:239-46.
7. Bradlow HL, Telang NT, Sepkovic DW, Osborne MP. 2-hydroxyestrone: the 'good' estrogen. *J Endocrinol* 1996;150 Suppl:S259-65.
8. Muti P, Bradlow HL, Micheli A, et al. Estrogen metabolism and risk of breast cancer: a prospective study of the 2:16-alpha-hydroxyestrone ratio in premenopausal and postmenopausal women. *Epidemiology* 2000;11:635-40.
9. Telang NT, Suto A, Wong GY, Osborne MP, Bradlow HL. Induction by estrogen metabolite 16 alpha-hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:634-8.
10. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
11. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
12. Straub RH, Konecna L, Hrach S, et al. Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2012-7.
13. Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, et al. Admission criteria for

immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev* 1984;28:47-55.

14. Klug TL, Bradlow HL, Sepkovic DW. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for simultaneous quantitation of 2- and 16 alpha-hydroxyestrone in urine. *Steroids* 1994;59:648-55.
15. Meilahn EN, De Stavola B, Allen DS, et al. Do urinary oestrogen metabolites predict breast cancer? Guernsey III cohort follow-up. *Br J Cancer* 1998;78:1250-5.
16. Lustig RH, Mobbs CV, Pfaff DW, Fishman J. Temporal actions of 16 alpha-hydroxyestrone in the rat: comparisons of lordosis

dynamics with other estrogen metabolites and between sexes. *J Steroid Biochem* 1989;33:417-21.

17. Cutolo M, Wilder R. Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 2000;26:825-39.
18. Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S, Masi AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:217-26.

EXTENDED REPORT

Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium

C Weidler*, C Holzer*, M Harbuz, R Hofbauer, P Angele, J Schölmerich, R H Straub

Ann Rheum Dis 2005;64:13–20. doi: 10.1136/ard.2003.016154

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:
Professor R H Straub,
Department of Internal
Medicine I, University
Hospital, 93042
Regensburg, Germany;
rainer.straub@
klinik.uni-regensburg.de

Accepted
22 February 2004

Objective: To investigate the correlation between density of nerve fibres and the presence of BDNF⁺ cells.
Methods: Densities of nerve fibres and BDNF⁺ cells were detected by quantitative immunohistochemistry in fresh synovial tissue from 52 patients with RA, 59 with OA, and 26 controls (Co). BDNF was also detected by in situ hybridisation.

Results: Sympathetic nerve fibre density was similar in Co and OA but markedly reduced in RA ($p=0.002$), whereas density of substance P positive (SP⁺) sensory nerve fibres was lower in OA than in Co and RA ($p=0.002$). The ratio of sympathetic/SP⁺ sensory nerve fibre density was highest in OA and Co, followed by RA. The correlation between density of sympathetic nerve fibres and SP⁺ sensory nerve fibres in OA ($R=0.425$, $p=0.001$) was strongly positive, had a positive trend in Co ($R=0.243$, NS), but was negative in RA ($R=-0.292$, $p=0.040$). In RA and OA tissue the density of BDNF⁺ cells was high in sublining areas but markedly lower in Co ($p=0.001$). BDNF⁺ cell density correlated positively with the ratio of sympathetic/SP⁺ sensory nerve fibre density in Co ($R=0.433$, $p=0.045$) and in OA ($R=0.613$, $p=0.015$), but not in RA ($R=0.101$, NS). Immunohistochemical double staining demonstrated that some macrophages and fibroblasts were positive for BDNF.

Conclusions: The correlation of density of SP⁺ sensory with sympathetic nerve fibres was positive in Co and OA but negative in RA. BDNF may have a stimulatory role on growth of sympathetic in relation to SP⁺ sensory nerve fibres in Co and OA, but not in RA.

Peripheral sympathetic neurotransmitters and their co-factors such as norepinephrine, neuropeptide Y (NPY), and adenosine inhibit important inflammatory functions such as, for example, production of tumour necrosis factor by monocytes/macrophages,^{1–4} production of oxygen radicals by neutrophils,^{5–7} and activity of natural killer cells.^{8–11} High concentrations of these neurotransmitters (10^{-7} to 10^{-5} mol/l via β -adrenoceptors, Y1 NPY receptors, or A2 adenosine receptors) down regulate many aspects of the innate immune system and, thus the presence of sympathetic nerve fibres should be favourable in the inflamed synovium of patients with rheumatoid arthritis (RA) (reviewed by Straub and Cutolo¹²). However, the density of sympathetic nerve fibres is dramatically reduced in inflamed RA synovium,^{13–14} whereas the density of proinflammatory substance P positive (SP⁺) sensory nerve fibres is increased in the synovium of patients with RA as compared with osteoarthritis (OA).¹⁵

The reasons for the imbalance of the density of sympathetic in relation to SP⁺ sensory nerve fibres is not yet known, but the ratio of neurotrophic factors to nerve repellent factors may have an important role.^{16–17} We have recently shown that the sympathetic nerve repellent factor semaphorin 3C is markedly up regulated in RA synovium as compared with OA or control tissue; this was not observed for nerve repellent factors of sensory nerve fibres.¹⁸ This might lead to a decrease of sympathetic nerve fibres in RA as compared with OA and controls. However, there is no good explanation why the density of sympathetic nerve fibres is higher in OA than in RA or controls. It is unlikely that the repellent factors of the semaphorin group play a part because repellent factors of sensory neurons were not detected in the tissue of all subgroups. On the other hand, changes of expression of

neurotrophic factors may be responsible for the observed imbalance of sympathetic and SP⁺ sensory nerve fibres.

Since the discovery of the original nerve growth factor (NGF) in the 1960s by Levi-Montalcini, other peripherally acting neurotrophins, such as brain derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3, neurotrophin-4, neurotrophin-5, and ciliary neurotrophic factor, have been described. In addition to their canonical role in promoting neuronal survival and growth, these molecules appear to regulate multiple aspects of the development of the nervous system in vertebrates, including neuronal differentiation, axon elongation, and target innervation.¹⁹ The growth promoting effects of the above mentioned neurotrophins on sensory or sympathetic neurons are unspecific because their receptors appear on both types of nerve fibres (see for example, Barbacid²⁰ and Chalazonitis²¹). Interestingly, NGF supports the inflammatory process and it is up regulated during inflammatory episodes in the skin,²² in rheumatoid synovium,²³ and in the bronchial system.²⁴ On the basis of its unspecific effects on both types of peripheral nerve fibres, NGF should induce nerve fibre sprouting of sympathetic and sensory nerve fibres. Because only SP⁺ sensory nerve fibres are increased in the inflamed synovium of patients with RA other mechanisms must be responsible for the observed imbalance.

In contrast with NGF, the role of BDNF in inflammation is not precisely known. BDNF is up regulated in rat dorsal root ganglia after acute peripheral inflammation.²⁵ Activated cells of the immune system express BDNF upon stimulation,^{26–27}

Abbreviations: APAAP, alkaline phosphatase–anti-alkaline phosphatase; BDNF, brain derived neurotrophic factor; NGF, nerve growth factor; NPY, neuropeptide Y; OA, osteoarthritis; RA, rheumatoid arthritis; SP, substance P; TH, tyrosine hydroxylase

* C Weidler and C Holzer contributed equally to this study.

Table 1 Basic characteristics of all patients with RA and OA

Characteristic	RA		OA	
	Entire group	Subgroup†	Entire group	Subgroup†
Number	52	{15}	59	{17}
Age (years), mean (SEM) [range]	65.2 (1.3) [39–84]	{66.2 (3.4) [39–84]}	68.9 (1.2) [41–88]	{67.9 (3.1) [49–88]}
Sex (F/M)	41/11	{14/1}	43/16	{15/2}
ESR (mm/1st h), mean (SEM)	32.0 (3.7)**	{35.6 (8.0)†}	15.2 (1.4)	{17.3 (3.2)}
CRP (mg/l), mean (SEM)	27.6 (4.4)**	{27.3 (8.9)*}	5.8 (0.6)	{5.1 (0.8)}
<i>Drugs (No (%) of patients)</i>				
Prednisolone	43 (83)	{12 (80)}	1 (2)	{0 (0)}
NSAID	41 (79)	{13 (87)}	28 (47)	{8 (53)}
Methotrexate	11 (21)	{3 (20)}	0 (0)	{0 (0)}
Leflunomide	4 (8)	{4 (27)}	0 (0)	{0 (0)}
Ciclosporin A	1 (2)	{1 (7)}	0 (0)	{0 (0)}
Azathioprine	3 (6)	{1 (7)}	0 (0)	{0 (0)}
Sulfasalazine	5 (10)	{3 (20)}	1 (2)	{0 (0)}
Hydroxychloroquine	4 (8)	{3 (20)}	0 (0)	{0 (0)}

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, † $p = 0.07$ for comparison of the two disease groups.

†Data in braces are the subgroup characteristics for the immunohistochemistry study on BDNF.

and BDNF has been found in inflammatory lesions in the brain and in the pancreas during pancreatitis.^{26–28} However, its expression has never been investigated in arthritic animals or in patients with RA or OA.

This study aimed at investigating the presence of BDNF⁺ cells in synovial tissue of patients with RA, OA, and traumatic controls. Furthermore, we wanted to investigate a possible relationship between the density of BDNF⁺ cells and the density of sympathetic/SP⁺ sensory nerve fibres.

PATIENTS AND METHODS

Patients and controls

Fifty two patients with RA and 59 patients with OA who underwent knee joint replacement surgery and 26 control subjects with acute trauma who underwent arthroscopic knee surgery were included without further selection. In the original pool of 30 control subjects, four patients had chronic traumatic joint affections. These latter control subjects had clear signs of inflammation so that they were removed from the analysis. The 26 remaining control subjects had acute disease and no visible signs of inflammation. Diagnosis of RA was based on the established American College of Rheumatology criteria.²⁹ All patients were informed about the purpose of the study and gave written consent. The study was approved by the ethical committee of the University of Regensburg.

Table 1 shows details of the clinical and laboratory data for the entire group and for the subgroup included in the BDNF immunohistochemical study. Respective control subjects (11 women, 15 men) had a mean (SEM) age of 32.2 (2.4) (range 16–60) years. Patients for the subgroup analysis included in the BDNF immunohistochemistry study are shown in braces in table 1. Respective control subjects (2 women, 5 men) had a mean (SEM) age of 41.1 (4.9) (16–60) years. Variables such as erythrocyte sedimentation rate, C reactive protein, and blood leucocyte count were measured by standard techniques. Although our control subjects were markedly younger, we decided to include them in order to present a completely different group without any longstanding inflammation. Furthermore, preliminary correlation analyses indicated that nerve fibre density was not related to age (see also “Results”). This group comprised patients with acute knee joint problems such as tibial plateau fracture, anterior cruciate ligament rupture, and loose bodies in the knee joint.

Synovial tissue preparation and immunohistochemistry

Synovial tissue samples were obtained immediately after opening the knee joint capsule or during arthroscopic surgery (in controls). The tissue for histology was prepared as described previously.¹⁴ Synovial tissue pieces of at least 3×3 mm² were used for histology. Samples intended for

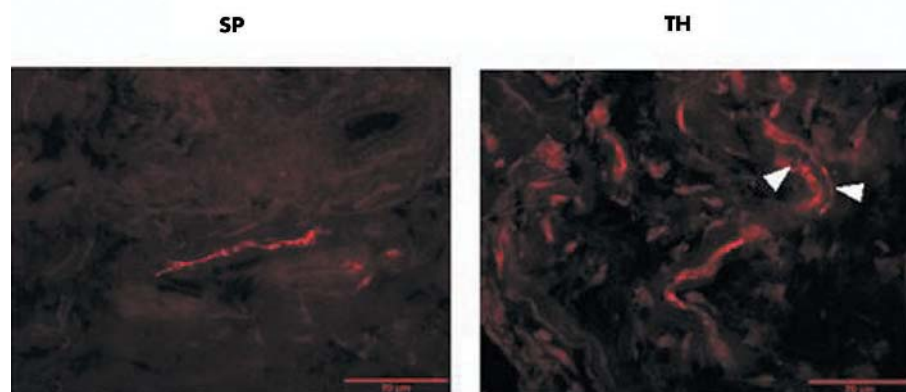


Figure 1 Representative immunohistochemistry of substance P (SP) positive sensory nerve fibres and sympathetic tyrosine hydroxylase (TH) positive nerve fibres. Note the typical juxtaposition of TH positive fibres and the structure of an artery (arrow heads). Micrographs were taken at ×400 magnification.

alkaline phosphatase–anti-alkaline phosphatase (APAAP) staining were immediately placed in protective freezing medium (Tissue Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, The Netherlands) and then quick frozen by floating on liquid nitrogen. Tissue samples for the detection of nerve fibres were fixed for 12–24 hours in phosphate buffered saline containing 3.7% formaldehyde, and then incubated in phosphate buffered saline with 20% sucrose for 12–24 hours. Thereafter, tissue was embedded in Tissue Tek and quick frozen. All tissue samples were stored at -80°C .

Histological evaluation was carried out as described previously.¹⁴ Briefly, the frozen tissue samples were cut into 5–8 μm thick sections. To determine the number of BDNF⁺ cells (catalogue No MAB248; R&D Systems, Wiesbaden, Germany) in the synovial tissue of each patient, eight cryosections were investigated using APAAP staining and the number of identified structures was averaged from 17 randomly selected high power fields of view ($\times 400$) and expressed per square millimetre. Because we did not have authentic BDNF, we controlled the positive BDNF staining by incubating the tissue with mouse isotype IgG control antibodies which always yielded a negative result. The determination of synovial innervation has been described previously.¹⁴ Briefly, six to eight cryosections (5–9 μm thick) of the formaldehyde/sucrose fixed tissue samples were used for immunohistochemistry with a primary antibody against tyrosine hydroxylase (TH⁺, the key enzyme for norepinephrine production in sympathetic nerve endings, catalogue No MAB318; Chemicon, Temecula, CA, USA) and against SP⁺ (the key neurotransmitter of SP⁺ sensory nerve fibres, catalogue No AB1566; Chemicon). An Alexa 546 conjugated secondary antibody (catalogue No A-11030 against mouse

IgG, catalogue No A-121010 against rabbit IgG; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) was used to achieve immunofluorescent staining of sympathetic and SP⁺ sensory nerve fibres (fig 1). The numbers of TH⁺ sympathetic and SP⁺ sensory nerve fibres per square millimetre were determined by averaging the number of stained nerve fibres (minimum length 50 μm , determined through a micrometre eyepiece) in 17 randomly selected high power fields of view ($\times 400$). We controlled the positive nerve fibre staining by incubating the tissue with polyclonal control antibodies which always yielded a negative result.

Immunofluorescence double staining of BDNF⁺ cells and macrophages/fibroblasts

Double staining of BDNF⁺ cells and macrophages/fibroblasts was carried out as follows: acetone fixed cryosections were incubated overnight with a polyclonal rabbit antihuman BDNF antibody (catalogue No AB6201-500; Abcam Ltd, Cambridge, UK). Thereafter, fibroblasts and macrophages were stained by mouse monoclonal antibodies against prolyl-4-hydroxylase or CD163 (catalogue No M0877 or M0794; Dako, Glostrup, Denmark). Immunofluorescence staining was achieved with F(ab)₂ fragments of goat antirabbit or antimouse IgG (Alexa Fluor 555 or 488, catalogue No. A-21430 or A-11017; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Nuclei were stained with DAPI (Vectashield mounting medium, catalogue No H-1200; Vector Laboratories, Burlingame, USA).

BDNF in situ hybridisation of synovial tissue

Synovial tissue was stored at -80°C before sectioning (20 μm) on a cryostat. Sections (4–6 per tissue) were

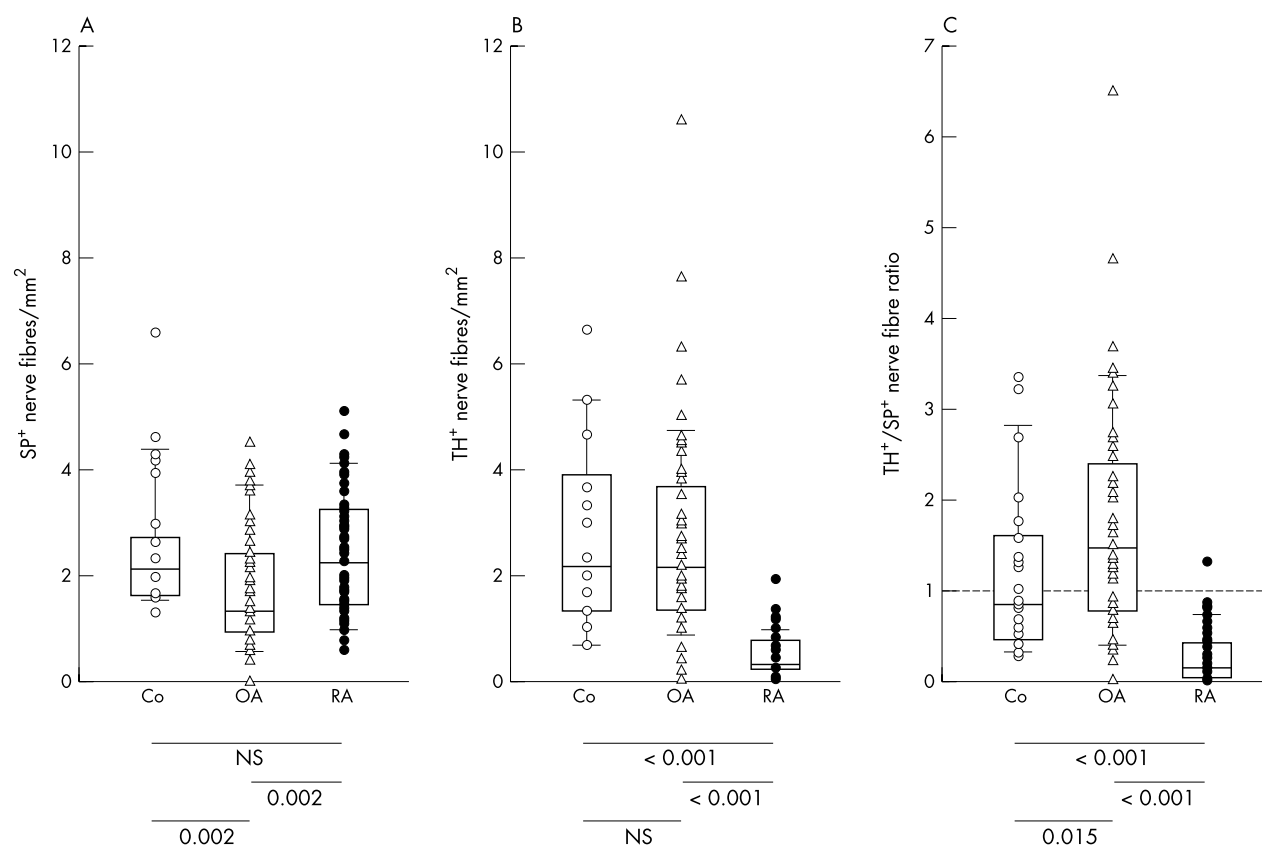


Figure 2 Density of sympathetic and SP⁺ sensory nerve fibres in control subjects (Co), patients with OA, and RA. (A) Density of SP⁺ sensory nerve fibres; (B) density of sympathetic TH⁺ nerve fibres; and (C) ratio of density of sympathetic/SP⁺ sensory nerve fibres. Values of p for comparison of group medians are given below the panels. The box plots demonstrate the 10th and 90th centile, the 25th and 75th centile, and the median.

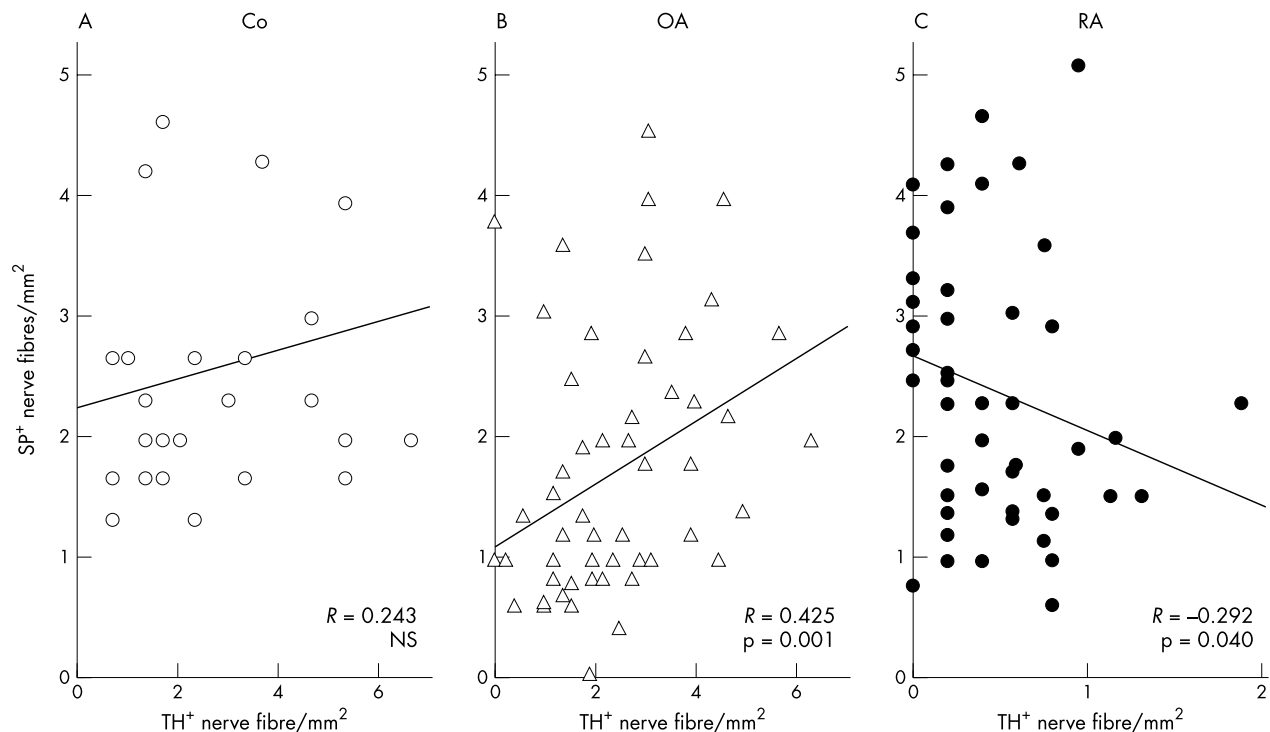


Figure 3 Interrelation between density of sympathetic TH⁺ nerve fibres and density of SP⁺ sensory nerve fibres in (A) control subjects (Co); (B) patients with OA; and (C) patients with RA. The linear regression line and its Pearson correlation coefficient are given.

mounted onto gelatin coated microscope slides that were stored at -80°C until required. In situ hybridisation histochemistry was carried out as described previously.³⁰ Briefly, the sections were taken through a series of dehydrating alcohol washes, air dried, and a [³⁵S]dATP 3' end labelled oligonucleotide BDNF probe added in hybridisation buffer. The probe sequence was 5'-CCA-GTG-CCT-CTT-GTC-TAT-GCC-CCT-GCA-GCC-CTC-CTT-TGT-GTA-CCC-CAT-3', representing nucleotides 746–795.³¹ The sections were incubated overnight at 37°C before washing to remove unbound and non-specifically bound probe. The sections were dried and exposed to autoradiography film. Further sections were dipped in photographic emulsion to visualise cellular distribution of the probe bound. Counter staining was carried out with haematoxylin and eosin.

Presentation of data and statistical analysis

Data are presented as mean (SEM). Groups were compared by the non-parametric Mann-Whitney test, correlations were calculated by Pearson's correlation analysis (SPSS/PC, version 11.5, SPSS Inc, Chicago, USA). Frequencies in two different groups were compared by χ^2 test using Yates's continuity correction or Fisher's exact test if possible. $p < 0.05$ was the level of significance.

We used the ratio "density of sympathetic TH⁺ nerve fibres/density of SP⁺ sensory nerve fibres" in order to demonstrate the relation between both types of nerve fibre (values are without units).¹⁵ To investigate the interrelation between the density of BDNF⁺ cells and the density of sympathetic TH⁺ or SP⁺ sensory nerve fibres, we used correlation analysis (x value: density of BDNF⁺ cells; y value: above mentioned nerve fibre ratio) and a ternary plot (x value: density of BDNF⁺ cells; y value: density of sympathetic TH⁺ nerve fibres; z value: density of SP⁺ sensory nerve fibres). A ternary plot is an analytical and plotting application that normalises and plots three values on a triangular diagram and three bivariate cross plots. In the plot, means and standard deviations are

calculated in the normalised space (see http://home.c2i.net/astandne/help_hm/english/terplot1.htm; accessed 27 September 2004). The ternary diagram was created using the standard ternary plot software of SigmaPlot 2002 (SPSS Inc, Chicago, USA).

RESULTS

Sympathetic and SP⁺ sensory innervation of synovial tissue

Figure 1 shows representative immunohistochemical stainings of SP⁺ sensory nerve fibres and sympathetic TH⁺ nerve fibres. Note the typical pattern of TH⁺ staining which follows larger arteries (fig 1). A significant reduction of SP⁺ sensory nerve fibres was found in patients with OA compared with patients with RA or control subjects with non-inflammatory conditions (fig 2A). This indicates a reduction of SP⁺ sensory innervation in patients with OA. For sympathetic synovial innervation, there was a clear reduction of sympathetic TH⁺ nerve fibres in patients with RA as compared with patients with OA and controls (fig 2B). No difference was seen between patients with OA and control subjects (fig 2B). The ratio of the density of sympathetic TH⁺ nerve fibres/SP⁺ sensory nerve fibres was markedly lower in patients with RA than in patients with OA and controls (fig 2C). Interestingly, patients with OA had a significantly higher ratio than controls (fig 2C), which indicates that patients with OA had the highest density of sympathetic in relation to SP⁺ sensory nerve fibres when compared with the other two groups.

Correlation analysis showed a trend for a positive interrelation between sympathetic TH⁺ nerve fibres and SP⁺ sensory nerve fibres in control subjects (fig 3A) and in patients with OA (fig 3B). In patients with RA, this interrelation was negative, which indicates inverse coupling of sympathetic and SP⁺ sensory nervous inputs to RA synovium (fig 3C).

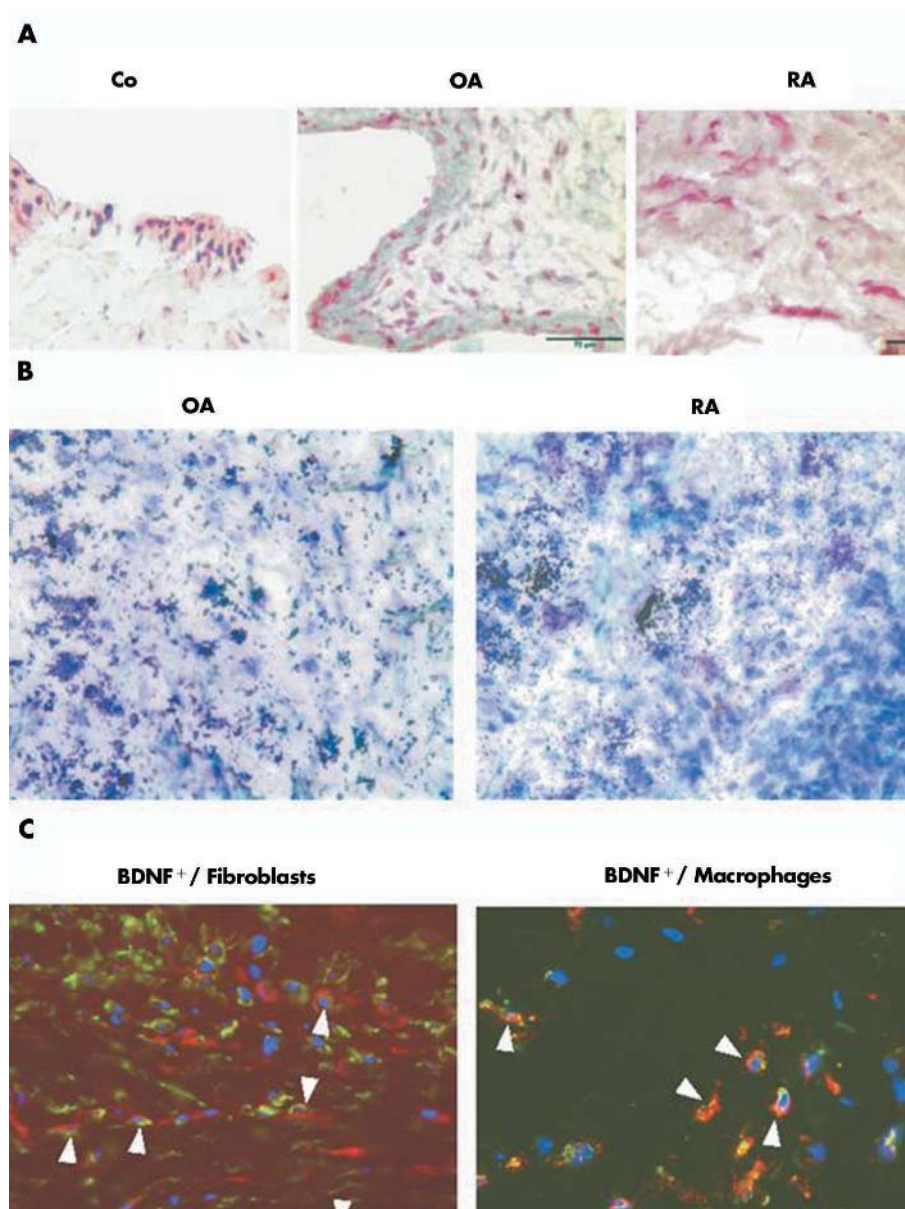


Figure 4 Immunohistochemistry of BDNF in synovial tissue. (A) Synovial tissue from a control subject without an inflammatory condition (Co), a patient with OA, and a patient with RA stains positive for BDNF. APAAP staining was used. (B) BDNF in situ hybridisation of synovial tissue from a patient with OA and RA. (C) Immunofluorescence double staining of BDNF⁺ cells (green fluorescence) versus fibroblasts (left panel: red fluorescence, prolyl-4-hydroxylase) or macrophages (right panel: red fluorescence, CD163). Nuclei were stained with DAPI. In all panels, respective control stainings were always negative. All micrographs were taken at $\times 400$ magnification.

In a receiver operator curve analysis including all investigated subjects, both the density of sympathetic nerve fibres and the ratio of the density of sympathetic nerve fibres divided by the density of SP⁺ nerve fibres turned out to be excellent variables to separate patients with RA from either patients with OA or control subjects. In this analysis, it was found that a cut off value of 0.94 for the density of sympathetic nerve fibres yielded the highest sensitivity of 92.0%, a specificity of 87.8%, and an accuracy of 89.4%. When the nerve fibre ratio was used as the variable, it was found that a cut off value of 0.50 yielded the highest sensitivity of 84.0%, a specificity of 85.4%, and an accuracy of 84.8%.

Because the control patients were markedly different in age, we investigated whether an interrelation existed between age and nerve fibre density in the various patient subgroups: no such correlation was found for control subjects

(age ν TH⁺: $R = 0.192$, $p = 0.348$; age ν SP⁺: $R = -0.056$, $p = 0.785$), patients with OA (age ν TH⁺: $R = 0.243$, $p = 0.069$; age ν SP⁺: $R = 0.127$, $p = 0.342$), and patients with RA (age ν TH⁺: $R = -0.090$, $p = 0.525$; age ν SP⁺: $R = 0.158$, $p = 0.273$).

In another analysis we compared women and men in order to investigate a possible difference in nerve fibre density. We detected no difference for density of sympathetic TH⁺ nerve fibres and SP⁺ sensory nerve fibres between women and men in the different patient groups (p values at least >0.20 , data not shown).

BDNF⁺ cells in synovial tissue

Neurotrophic factors such as BDNF may potentially influence the growth of sympathetic and SP⁺ sensory nerve fibres in a very differential way (supporting the growth of one, inhibiting the other). To link the expression of BDNF to

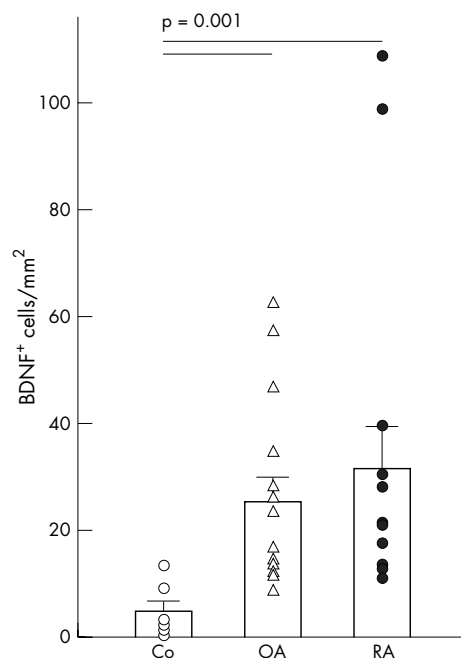


Figure 5 Density of BDNF⁺ cells in control subjects (Co), patients with OA, and patients with RA. Values of *p* for comparison of group medians are given.

sympathetic and SP⁺ sensory nerve fibres, BDNF was detected immunohistochemically: BDNF⁺ cells were found in all three patient groups (fig 4A). In all three patient groups, BDNF cells were located in the lining area (fig 4A). However, only in patients with RA and OA were the cells in the synovial sublining area stained positive for BDNF (fig 4A). A representative *in situ* hybridisation of OA and RA synovial sublining tissue demonstrated marked expression of BDNF mRNA (fig 4B). Immunohistochemical double staining confirmed that BDNF⁺ cells most often stained positive also for markers of fibroblasts (prolyl-4-hydroxylase) and macrophages (CD163), respectively (fig 4C). Furthermore, there was a highly significant increase in the density of BDNF⁺ cells in patients with RA and OA in comparison with control subjects (fig 5). This indicates that BDNF is particularly expressed under more inflammatory conditions. In the different groups, age and sex were not related to the density of BDNF⁺ cells (data not shown).

Interrelation between BDNF⁺ cells and sympathetic TH⁺ or SP⁺ sensory nerve fibres

A correlation analysis for the density of BDNF⁺ cells and the nerve fibre ratio demonstrated a positive interrelation in control subjects and patients with OA (figs 6A and B), but no such relationship existed in patients with RA (fig 6C). In controls and patients with OA this indicates that increased density of BDNF⁺ cells is linked to a higher ratio of sympathetic nerve fibres to SP⁺ sensory nerve fibres.

In the ternary plot, control subjects clearly differed from patients with RA and OA. This is demonstrated by the lower density of BDNF⁺ cells and higher density of sympathetic TH⁺ nerve fibres (fig 6D, open circles). Patients with RA and some patients with OA had a high density of BDNF⁺ cells and very low density of sympathetic TH⁺ nerve fibres (fig 6D, red circles and black triangles in lower left corner). A subgroup of patients with OA exists who had an intermediate pattern (fig 6D, black triangles, between lower left corner and control subjects).

DISCUSSION

This is the first study which has demonstrated similar synovial density of sympathetic nerve fibres in a control group without inflammation in comparison with patients with OA. This analysis was important in order to give an unbiased absolute measure of the density of sympathetic nerve fibres in non-inflamed synovial tissue. In addition, we confirmed the striking loss of sympathetic nerve fibres in patients with RA^{14, 15} as compared with patients with OA and control subjects.

In animal studies, reduction of nerve fibre density was dependent on the stage of the disease.³² However, we were unable to link reduction of sympathetic nerve fibres to markers of inflammation or disease duration. Our patients had long term disease, and it seems that in this stage of the disease sympathetic nerve fibres are almost absent. In control subjects and patients with OA, the densities of sympathetic and SP⁺ sensory nerve fibres were positively correlated, whereas in patients with RA this correlation was negative.

Because high levels of sympathetic neurotransmitters inhibit many immunological functions, particularly, those of the innate immune system,¹⁻¹¹ a normal density of sympathetic nerve fibres of about 2.6 nerve fibres/mm² may be necessary for a balanced immune reaction (= the value of the control subjects). This is particularly important because the density of proinflammatory SP⁺ sensory nerve fibres remains unaltered.^{14, 15} It is important to mention that low concentrations of norepinephrine (<10⁻⁷ mol/l, via α -adrenoceptors) and adenosine (<10⁻⁷ mol/l, via A1 adenosine receptors) can exert a completely opposite, now pro-inflammatory influence on the immune system (summarised by Straub and Cutolo¹²). The equilibrium, as estimated by the ratio of the density of sympathetic to the density of SP⁺ sensory nerve fibres in control subjects and patients with OA, is typically above 0.50–1.00. We may speculate that under normal conditions this equilibrium is maintained in order to establish a balanced tissue supply. This balance is largely shifted to proinflammatory SP⁺ sensory nerve fibres in patients with RA. At this point the question arises why, in this inflammatory process, the density of sympathetic nerve fibres decreases and the density of SP⁺ sensory nerve fibres remains constant.

The presence of nerve fibres in peripheral tissue is controlled by nerve growth factors and nerve repellent factors. It has been repeatedly demonstrated that NGF is present in inflamed synovial tissue and fluid in RA,²³ in circulating blood,³³ and in the synovial fluid of patients with spondyloarthropathies.³⁴ NGF is produced by different leucocytes upon stimulation (see, for example, Pezzati *et al*³⁵ and Morgan *et al*³⁶), and was found to be an important stimulator of wound healing.³⁷⁻³⁹ In contrast with NGF, the presence of BDNF has never been described in synovial tissue in animals or men. BDNF is up regulated in rat dorsal root ganglia after acute peripheral inflammation.²⁵ Activated cells of the immune system express BDNF,^{26, 27} and BDNF was found in inflammatory lesions.^{26, 28} Both BDNF and NGF are up regulated in inflammatory lesions. Our study demonstrated increased density of BDNF⁺ cells in inflamed synovium of patients with RA and OA but not in control subjects. The difference was most pronounced in the sublining area, and both fibroblasts and macrophages stained positive for BDNF.

Moreover, we tried to link cellular expression of BDNF to the described dissociation of sympathetic versus SP⁺ sensory nerve fibres. The analysis showed that the density of BDNF⁺ cells is positively related to the increased density of sympathetic in relation to SP⁺ sensory nerve fibres in control subjects and patients with OA, but not in patients with RA. One may speculate that BDNF supports the growth of

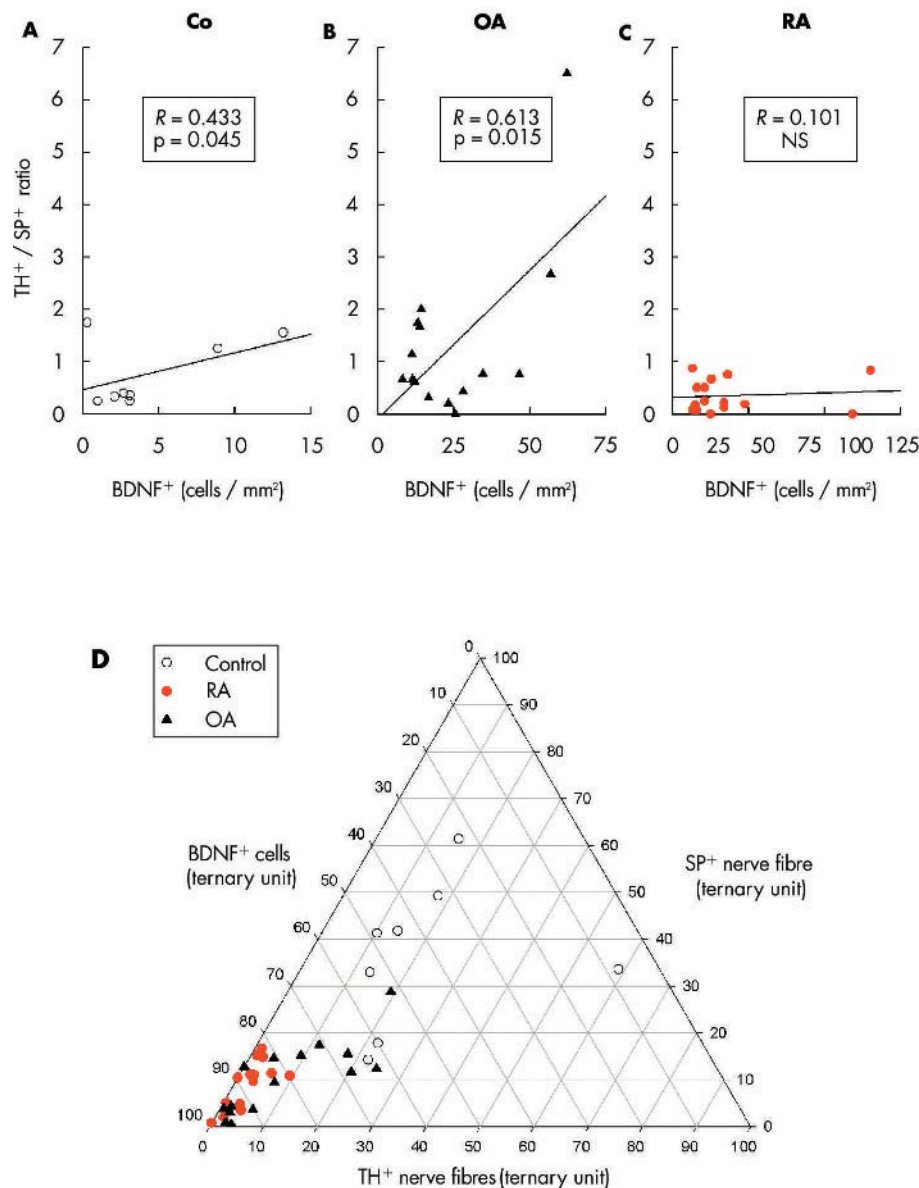


Figure 6 Interrelation of the density of BDNF⁺ cells and the ratio of the density of sympathetic TH⁺ nerve fibres/the density of SP⁺ sensory nerve fibres in (A) control subjects (Co); (B) patients with OA; and (C) patients with RA. The linear regression line and its Pearson correlation coefficient are given. (D) Ternary plot of the density of BDNF⁺ cells, the density of sympathetic TH⁺ nerve fibres, and the density of SP⁺ sensory nerve fibres. A ternary plot is an analytical tool that normalises and plots three values on a triangular diagram. In the plot, means and standard deviations are calculated in the normalised space (SigmaPlot 2002).

sympathetic nerve fibres more than the growth of SP⁺ sensory nerve fibres, which may be disrupted in patients with RA. As patients with RA in comparison with OA and controls demonstrate increased density of the sympathetic nerve repellent factor semaphorin 3C in synovial tissue,¹⁸ the presence of BDNF may not influence the growth of sympathetic nerve fibres in the same way as in controls and patients with OA.

Although the deductive nature of our approach does not allow us to find a causative relationship between BDNF and nerve fibre dissociation, it stimulates new ideas for following up this intriguing subject in experimental models of arthritis. In addition, the decrease of visible nerve fibres may also depend on exaggerated release of neuropeptides or alterations of expression of key enzymes such as TH during the inflammatory process.^{16, 17} Nevertheless, it seems obvious that the detected loss of visible nerve fibres is probably linked to functional alterations of these neuronal pathways.

A second interesting finding was the decreased density of SP⁺ sensory nerve fibres in patients with OA as compared with control subjects and patients with RA. At present, we do not know how the loss of SP⁺ sensory nerve fibres influences

the osteoarthritic process but one may speculate that loss of joint sensation would lead to continuous mechanical micro-traumas.^{40–41} Furthermore, loss of SP may lead to a lack of growth promoting factors because SP can stimulate extracellular matrix production etc.^{42–44} Both conditions may lead to a loss of joint protection in patients with OA.

In conclusion, the interrelation of the density of SP⁺ sensory and sympathetic nerve fibres was positive in control subjects and OA but negative in RA, which demonstrates inverse coupling of these two nervous systems in RA synovium. BDNF, a neurotrophic factor, may have a stimulatory role on the growth of sympathetic in relation to SP⁺ sensory nerve fibres in control subjects and OA, which may not be the case in RA. Further studies will be needed to prove whether BDNF is a relevant cofactor for the observed dissociation of sympathetic versus SP⁺ sensory nerve fibres in animal models of arthritis.

ACKNOWLEDGEMENTS

Part of this study were funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Str 511/10-1) and by the respective institutions.

Authors' affiliations

C Weidler, C Holzer, J Schölmerich, R H Straub, Department of Internal Medicine I, University Hospital, 93042 Regensburg, Germany
M Harbuz, Department of Clinical Medicine, University of Bristol, Bristol, BS1 3NY, UK
R Hofbauer, Department of Orthopaedic Surgery, University of Regensburg, 93042 Regensburg, Germany
P Angele, Department of Trauma Surgery, University of Regensburg, 93042 Regensburg, Germany

REFERENCES

- Renz H, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gerns D. Release of tumor necrosis factor- α from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J Immunol* 1988;141:2388–93.
- Le Moine O, Stordeur P, Schandene L, Marchant A, De Groote D, Goldman M, et al. Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J Immunol* 1996;156:4408–14.
- Guirao X, Kumar A, Katz J, Smith M, Lin E, Keogh C, et al. Catecholamines increase monocyte TNF receptors and inhibit TNF through beta 2-adrenoreceptor activation. *Am J Physiol* 1997;273:E1203–8.
- Straub RH, Günzler C, Miller LE, Cutolo M, Schölmerich J, Schill S. Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro. *FASEB J* 2002;16:993–1000.
- Weiss M, Schneider EM, Liebert S, Mettler S, Lemoine H. Vasoactive drugs inhibit oxygen radical production of neutrophils. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1997;19:239–63.
- Kubersky SM, Hirschhorn R, Broekman MJ, Cronstein BN. Occupancy of adenosine receptors on human neutrophils inhibits respiratory burst stimulated by ingestion of complement-coated particles and occupancy of chemotactant but not Fc receptors. *Inflammation* 1989;13:591–9.
- Fredholm BB, Zhang Y, van der Ploeg I. Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1996;354:262–7.
- Whalen MM, Bankhurst AD. Effects of beta-adrenergic receptor activation, cholera toxin and forskolin on human natural killer cell function. *Biochem J* 1990;272:327–31.
- Schedlowski M, Falk A, Rohne A, Wagner TO, Jacobs R, Tewes U, et al. Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells. *J Clin Immunol* 1993;13:344–51.
- Nair MP, Schwartz SA, Wu K, Kronfol Z. Effect of neuropeptide Y on natural killer activity of normal human lymphocytes. *Brain Behav Immun* 1993;7:70–8.
- Priebe T, Kandil O, Nakic M, Pan BF, Nelson JA. Selective modulation of antibody response and natural killer cell activity by purine nucleoside analogues. *Cancer Res* 1988;48:4799–803.
- Straub RH, Cutolo M. Involvement of the hypothalamic–pituitary–adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum* 2001;44:493–507.
- Pereira da Silva JA, Carmo-Fonseca M. Peptide containing nerves in human synovium: immunohistochemical evidence for decreased innervation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1990;17:1592–9.
- Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 2000;14:2097–107.
- Miller LE, Grifka J, Schölmerich J, Straub RH. Norepinephrine from synovial tyrosine hydroxylase positive cells is a strong indicator of synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:427–35.
- Konttinen YT, Kempainen P, Segerberg M, Hukkanen M, Rees R, Santavirta S, et al. Peripheral and spinal neural mechanisms in arthritis, with particular reference to treatment of inflammation and pain. *Arthritis Rheum* 1994;37:965–82.
- Matucci-Cerinic M, Konttinen Y, Generini S, Cutolo M. Neuropeptides and steroid hormones in arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10:220–35.
- Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Schölmerich J, et al. Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1156–63.
- Kirstein M, Farinas I. Sensing life: regulation of sensory neuron survival by neurotrophins. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1787–802.
- Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 1994;25:1386–403.
- Chalazonitis A. Neurotrophin-3 as an essential signal for the developing nervous system. *Mol Neurobiol* 1996;12:39–53.
- Shu XQ, Mendell LM. Neurotrophins and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7693–6.
- Aloe L, Tuveri MA, Carcassi U, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35:351–5.
- Braun A, Lommatzsch M, Lewin GR, Virchow JC, Renz H. Neurotrophins: a link between airway inflammation and airway smooth muscle contractility in asthma? *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:163–5.
- Cho HJ, Kim JK, Zhou XF, Rush RA. Increased brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation. *Brain Res* 1997;764:269–72.
- Kerschensetter M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misdeld T, Klinkert WE, et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 1999;189:865–70.
- Barouch R, Appel E, Kazimirsky G, Braun A, Renz H, Brodie C. Differential regulation of neurotrophin expression by mitogens and neurotransmitters in mouse lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2000;103:112–21.
- Toma H, Winston JH, Micci MA, Li H, Hellmich HL, Pasricha PJ. Characterization of the neurotrophic response to acute pancreatitis. *Pancreas* 2002;25:31–8.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315–24.
- Harbuz MS, Lightman SL. Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat. *J Endocrinol* 1989;122:705–11.
- Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, et al. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 1989;341:149–52.
- Imai S, Tokunaga Y, Konttinen YT, Maeda T, Hukuda S, Santavirta S. Ultrastructure of the synovial sensory peptidergic fibers is distinctively altered in different phases of adjuvant induced arthritis in rats: ultramorphological characterization combined with morphometric and immunohistochemical study for substance P, calcitonin gene related peptide, and protein gene product 9.5. *J Rheumatol* 1997;24:2177–87.
- Matucci-Cerinic M, Giacomelli R, Pignone A, Cagnoni ML, Generini S, Casale R, et al. Nerve growth factor and neuropeptides circulating levels in systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Rheum Dis* 2001;60:487–94.
- Dicou E, Perrot S, Menkes CJ, Masson C, Nerrière V. Nerve growth factor (NGF) autoantibodies and NGF in the synovial fluid: implications in spondyloarthropathies. *Autoimmunity* 1996;24:1–9.
- Pezzatti P, Stanisiz AM, Marshall JS, Bienenstock J, Stead RH. Expression of nerve growth factor receptor immunoreactivity on follicular dendritic cells from human mucosa associated lymphoid tissues. *Immunology* 1992;76:485–90.
- Morgan B, Thorpe LW, Marchetti D, Perez-Polo JR. Expression of nerve growth factor receptors by human peripheral blood mononuclear cells. *J Neurosci Res* 1989;23:41–5.
- Li AK, Koroly MJ, Schattenkerk ME, Malt RA, Young M. Nerve growth factor: acceleration of the rate of wound healing in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4379–81.
- Lawman MJ, Boyle MD, Gee AP, Young M. Nerve growth factor accelerates the early cellular events associated with wound healing. *Exp Mol Pathol* 1985;43:274–81.
- Tuveri M, Generini S, Matucci-Cerinic M, Aloe L. NGF, a useful tool in the treatment of chronic vasculitic ulcers in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2000;356:1739–40.
- O'Connor BL, Brandt KD. Neurogenic factors in the etiopathogenesis of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1993;19:581–605.
- O'Connor BL, Visco DM, Brandt KD, Myers SL, Kalasinski IA. Neurogenic acceleration of osteoarthritis. The effects of previous neurectomy of the articular nerves on the development of osteoarthritis after transection of the anterior cruciate ligament in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 1992;74:367–76.
- Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 1985;315:61–3.
- Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Dolara P, Maggi CA. NK1-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. *Br J Pharmacol* 1990;100:11–4.
- Katayama I, Nishioka K. Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation: possible involvement of neuropeptide in tissue fibrosis. *J Dermatol Sci* 1997;15:201–6.

Achilles tendinosis is associated with sprouting of substance P-positive nerve fibres

Concise report

Thomas E. O. Schubert^{1*} MD, Claudia Weidler^{2*} BSc, Klaus Lerch³ MD, Ferdinand Hofstädter¹ MD, and Rainer H. Straub² MD

*Both authors contributed equally

¹Department of Pathology, University of Regensburg, Regensburg, Germany

²Department of Internal Medicine I, University of Regensburg, Regensburg, Germany

³Department of Orthopaedic Surgery, University of Regensburg, Bad Abbach, Germany

Running title: Achilles tendinosis and sensory nerves

Corresponding author:

Thomas Schubert, Department of Pathology, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany

Telephone: 0049-941-9446606, FAX: 0049-941-9446602

Email address: thomas.schubert@klinik.uni-regensburg.de

ABSTRACT

Objectives: To identify and characterise nerve fibres and inflammatory alterations in painful Achilles tendinosis in order to gain evidence regarding the origin of pain in Achilles tendinosis.

Methods: We compared 10 tendon samples from patients with a prior history of painful Achilles tendinosis with 10 samples from spontaneously ruptured tendons without prior pain history by means of immunohistochemistry and conventional histology.

Results: Granulation tissue could be demonstrated in 8 out of 10 cases of Achilles tendinosis. The content of nociceptive substance P (SP)-positive nerve fibres was significantly increased, and there was an inflammatory infiltration consisting of B and T lymphocytes. Additionally, we found in 6 of 10 samples small foci with iron positive hemosiderophages indicating prior micro traumatic events. None of the spontaneously ruptured tendons contained granulation tissue or hemosiderophages. Inflammatory infiltration in these patients consisted almost exclusively of granulocytes and the content of SP-positive nerve fibres was low. The density of sympathetic nerve fibres was not different in the two conditions.

Conclusion: Achilles tendinosis is associated with the presence of granulation tissue, hemosiderophages and substance P-positive nerve fibres, which may transmit the clinically pertinent pain. We hypothesise that Achilles tendinosis may be caused by repeated micro traumata with ensuing organisation that is accompanied by sprouting of nociceptive substance P-positive nerve fibres.

Key words: Achilles tendinosis, Achillodynia, substance P, nerve fibre, granulation tissue

INTRODUCTION

Achilles tendinosis, also known as Achillodynia is viewed as a degenerative alteration of the Achilles tendon accompanied by pain and often associated with tendon thickening. It is common in athletes but occurs in non-athletes as well ¹. Surgical specimens obtained from affected tendons reveal a range of degenerative changes such as changes in tendon fibre structure and arrangement as well as an increase in glycosaminoglycans which may explain the swelling of the tendon ². The pathophysiology of Achilles tendon pain is still unclear. The content of nociceptive nerve fibres can increase during inflammatory conditions e.g. in rheumatoid arthritis ³ or in the course of wound healing, healing of fractures and other lesions ⁴⁻⁷. To elucidate one aspect of the pathophysiology of pain in Achilles tendinosis we studied 10 tendons from patients suffering from Achilles tendinosis and 10 tendons from spontaneous traumatic Achilles tendon ruptures with regard to inflammatory infiltrate and innervation.

MATERIAL AND METHODS

Patients. Ten Achilles tendon samples obtained from patients suffering from Achilles tendinosis and 10 samples from spontaneously ruptured Achilles tendons without prior pain history were submitted to the department of Pathology between November 2000 and September 2003 for routine histological examination. The diagnostic criteria for Achilles tendinosis were tendon pain for several months and swelling of the tendon in the distal portion. Only spontaneously ruptured tendons, which were resected within, 48h after injury were included in the study. Characteristics of the patients are given in table 1.

Table 1 Characteristics of the patients investigated in this study

Variable	Tendon Rupture	Tendinosis
Male patients	8	7
Female patients	2	3
Age (years), mean (SD)	48.0 (13.8)	47.3 (13.0)
Duration of pain before operation (months), range	0	6 to 120 ^{&}
Number of patients who received paratendinous corticosteroid injections	0	4
Number of patients with additional pathological conditions	1*	2**

[&]Three patients reported pain for more than 12 months

*The patient suffered from hypertension.

**One patient suffered from hyperuricaemia without manifest gout, the second patient suffered from calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease (there were no calcium pyrophosphate dihydrate deposits visible in the tendon on microscopic examination)

Immunohistochemistry of inflammatory cells and iron staining. Formalin fixed tissue was dehydrated and embedded in paraffin. Paraffin sections 3 to 5 µm thick were mounted on “Superfrost Plus” slides, heated for 20 minutes at 72°C, deparaffinized and rehydrated. For antigen retrieval sections were placed in a microwave for 30 minutes at 240 W in a citrate buffer at pH=7.3, then cooled to room temperature. After rinsing the slides endogenous peroxidase activity was blocked by using methanolic peroxide, the slides were rinsed again, and primary monoclonal antibody against CD3 for the detection of T-lymphocytes, CD20 for B-lymphocytes, or

CD68 for macrophages (DAKO, Hamburg, Germany) in a dilution of 1:100 was applied. All slides were incubated using a Ventana machine and each antibody incubation was performed at 37°C and labelled Streptavidin-biotin-peroxidase method at 37°C was used to visualise positive reaction (Ventana Medical Systems basic DAB detection kit, Ventana Medical Systems Inc., USA). To detect hemosiderophages paraffin sections were stained by Turnbull's acid Ferro cyanide reaction. Granulocytes were counted in H&E stained sections prepared according to standard protocols.

The numbers of granulocytes, iron-positive cells, CD3, CD20 and CD68 positive cells were evaluated in 10 randomly selected high power fields of view (400x) and expressed per square millimetre.

Immunohistochemistry of nerve fibres. The determination of the substance P (SP) positive sensory nerve fibres and sympathetic tyrosine hydroxylase (TH) positive nerve fibres has been described previously ³. Deparaffinized and rehydrated sections were blocked and incubated overnight with primary antibodies against TH or SP (Chemicon, Temecula, CA, USA). Immunofluorescent staining was achieved using Alexa 546 conjugated secondary antibodies against mouse or rabbit IgG (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). The numbers of TH- and SP-positive nerve fibres were evaluated in 17 randomly selected high power fields of view (400x) and expressed per square millimetre.

Statistical analysis. The individual values of both groups were compared by Mann-Whitney test (SPSS V.11.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Correlations were analysed using Spearman rank correlation analysis (SPSS). A p-value below 0.05 was the significance level.

RESULTS

Ten Achilles tendon samples obtained from patients suffering from Achilles tendinosis and 10 samples from spontaneously ruptured Achilles tendons without prior pain history were studied to characterise the innervation, inflammatory infiltration, presence of granulation tissue and hemosiderophages. We found that the content of B-lymphocytes, T-lymphocytes and macrophages was significantly higher in Achilles tendinosis samples (Fig.1A-C) whereas the content of granulocytes tended to be higher in tissue from ruptured tendons (Fig.1D). Furthermore, in tendon samples from Achilles tendinosis patients granulation tissue frequently containing hemosiderophages was found in 8 out of 10 specimens (Fig.1E). Granulation tissue consisted of clusters of capillaries embedded in a fibroblast-rich stroma infiltrated by macrophages, B- and T-lymphocytes. None of the samples from spontaneously ruptured tendons contained granulation tissue or hemosiderophages (Fig.1E). The amount of SP-positive nerve fibres was significantly higher in tissue from Achilles tendinosis patients compared to spontaneously ruptured tendons (Fig.2). On average 1.06 SP-positive nerve fibres per mm² were found in the Achilles tendinosis group and 0.35 SP-positive nerve fibres per mm² in ruptured tendons. The number of TH-positive nerve fibres did not differ significantly between both groups (Fig.2). The mean values for TH-positive nerve fibres per mm² for the Achilles tendinosis group and for ruptured tendons were 1,00 and 0.18, respectively.

In a correlation analysis in patients with tendinosis, T-cells were positively correlated with B-cells (Spearman rank correlation coefficient=0.683, p=0.020) and hemosiderophages (Spearman rank correlation coefficient=0.710, p=0.014).

DISCUSSION

The origin of Achilles tendinosis has not been elucidated so far. Recently, neovascularization in the affected tendon section correlating with pain was demonstrated by means of ultrasonography and MR imaging⁸⁻¹⁰. The finding was confirmed by immunohistochemistry revealing neovascularization accompanied by nerve structures which were not further characterised^{8;10}.

We compared 10 tendon samples from patients with a prior history of Achillodynia with 10 samples from spontaneously ruptured tendons without prior pain history by means of immunohistochemistry and conventional histology. Granulation tissue could be demonstrated in 8 out of 10 cases of Achilles tendinosis. The granulation tissue consisted of capillary vessels accompanied by an inflammatory infiltrate consisting of macrophages, B- and T-lymphocytes. None of the spontaneously ruptured tendons contained granulation tissue or significant amounts of macrophages, B- and T-lymphocytes. Instead they were infiltrated by large numbers of granulocytes as has to be expected in the case of an acute traumatic event.

The content of nociceptive SP-positive nerve fibres was found to be significantly higher in Achilles tendinosis samples compared to tendon samples obtained from spontaneously ruptured tendons whereas the content of TH-positive nerve fibres did not differ. Spontaneously ruptured tendons were used as control group because immunohistochemistry for SP and TH in normal tendons taken from corpses did not deliver reproducible data. There are no reports on the content of sensory nerve fibres of healthy human Achilles tendon in the literature. Both ruptured and Achilles tendinosis tendons contained low numbers of sensory nerve fibres compared to synovial tissue of healthy subjects which contains 2,5 TH-positive and 3,1 SP-positive nerve fibres per mm²¹¹. The nerve fibres found in Achilles tendinosis

specimens were frequently located next to small vessels in granulation tissue. Since we often found hemosiderophages within the granulation tissue, we hypothesise that micro traumatic events may have induced the formation of granulation tissue within the tendon. The degenerative alterations described in Achilles tendinosis may favour the occurrence of micro traumata. The growth of granulation tissue is accompanied by sprouting of sensory nerve fibres as demonstrated in animal models for wound healing ^{6;7}. Interestingly, no similar increase of sympathetic nerve fibres was found in our Achilles tendinosis specimens. The pattern of organisation of experimentally ruptured rat Achilles tendons was studied by Ackermann et al. ¹². They found that uncompromised Achilles tendons from rats are devoid of nerve fibres, however, after rupture of the tendon extensive sprouting of nerve fibres into the tendon takes place during the healing phase. SP-positive nerve fibres were observed in the emerging granulation tissue next to the rupture site one week after rupture and reached a maximum density at week 4 after rupture. In correlation, 1 to 4 weeks after rupture the nociception to thermal and mechanical stimuli increased ¹². Since we obtained tendon samples very early after tendon rupture, no such sprouting phenomenon was observed in the ruptured Achilles tendons. With the completion of the regenerative process SP-positive nerve fibres withdrew from the tendon tissue 8 weeks after rupture ¹². Assuming a similar time course of organisation, the simultaneous occurrence of granulation tissue, nerve fibres and hemosiderophages accompanied by longstanding local pain in Achilles tendinosis indicates that repeated micro traumata may have occurred which maintain the presence of granulation tissue and SP-positive nerve fibres.

Besides transmitting nociceptive signals, the sprouting sensory nerve fibres may have profound effects on tendon structure since it has been demonstrated that SP

stimulates the proliferation of fibroblasts¹³ and production of TGF β by fibroblasts¹⁴ potentially contributing to thickening of the tendon observed in Achilles tendinosis. To summarise, we found granulation tissue, hemosiderophages and substance P-positive nerve fibres in tendons affected by Achilles tendinosis. The nociceptive nerve fibres may transmit the clinically pertinent pain. We hypothesise that Achilles tendinosis may be caused by repeated micro traumata with ensuing organisation that is accompanied by sprouting of nociceptive substance P-positive nerve fibres.

Acknowledgments

Supported by the DFG (Str 511/10-1) and the University of Regensburg funding program ReForM C

Reference List

1. Rolf C, Movin T. Etiology, histopathology, and outcome of surgery in achillodynia. *Foot Ankle Int.* 1997;**18**:565-9.
2. Movin T, Gad A, Reinholt FP, Rolf C. Tendon pathology in long-standing achillodynia. Biopsy findings in 40 patients. *Acta Orthop.Scand.* 1997;**68**:170-5.
3. Miller LE, Justen HP, Scholmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J.* 2000;**14**:2097-107.
4. Wolf K, Hocherl E, Farkas T, Pfister C. [Expression and dynamics of peptidergic nerve fibers in granulation tissue after distance osteosynthesis]. *Unfallchirurg* 2001;**104**:948-54.
5. Walsh DA, Hu DE, Mapp PI, Polak JM, Blake DR, Fan TP. Innervation and neurokinin receptors during angiogenesis in the rat sponge granuloma. *Histochem.J.* 1996;**28**:759-69.
6. Dunnick CA, Gibran NS, Heimbach DM. Substance P has a role in neurogenic mediation of human burn wound healing. *J.Burn Care Rehabil.* 1996;**17**:390-6.

7. Lai X, Wang Z, Wei L, Wang L. Effect of substance P released from peripheral nerve ending on endogenous expression of epidermal growth factor and its receptor in wound healing. *Chin J.Traumatol.* 2002;**5**:176-9.
8. Shalabi A, Kristoffersen-Wiberg M, Papadogiannakis N, Aspelin P, Movin T. Dynamic contrast-enhanced mr imaging and histopathology in chronic achilles tendinosis. A longitudinal MR study of 15 patients. *Acta Radiol.* 2002;**43**:198-206.
9. Zanetti M, Metzdorf A, Kundert HP, Zollinger H, Vienne P, Seifert B *et al.* Achilles tendons: clinical relevance of neovascularization diagnosed with power Doppler US. *Radiology* 2003;**227**:556-60.
10. Alfredson H, Ohberg L, Forsgren S. Is vasculo-neural ingrowth the cause of pain in chronic Achilles tendinosis? An investigation using ultrasonography and colour Doppler, immunohistochemistry, and diagnostic injections. *Knee.Surg.Sports Traumatol.Arthrosc.* 2003;**11**:334-8.
11. Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Scholmerich J *et al.* Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;**50**:1156-63.
12. Ackermann PW, Li J, Lundeborg T, Kreicbergs A. Neuronal plasticity in relation to nociception and healing of rat achilles tendon. *J.Orthrop.Res.* 2003;**21**:432-41.
13. Katayama I, Nishioka K. Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation: possible involvement of neuropeptide in tissue fibrosis. *J.Dermatol.Sci.* 1997;**15**:201-6.
14. Lai XN, Wang ZG, Zhu JM, Wang LL. Effect of substance P on gene expression of transforming growth factor beta-1 and its receptors in rat's fibroblasts. *Chin J.Traumatol.* 2003;**6**:350-4.

Figure 1

Determination of cell types in painful Achilles tendinosis and ruptured Achilles tendon.

The numbers of (A) CD3+ and (B) CD20+ lymphocytes and (C) CD68+ macrophages were determined by immunohistochemistry in 10 tendons from Achilles tendinosis patients and 10 spontaneously ruptured tendons.

The number of (D) granulocytes was determined on H&E stained sections and the number of (E) iron positive hemosiderophages was determined in sections stained by Turnbull's acid Ferro cyanide reaction. The number of all cells was averaged from 10 high power fields and expressed as the number of cells per 1mm^2 . Abbreviation: AchDyn, painful Achilles tendinosis.

Figure 2

Comparison of sympathetic and nociceptive nerve fibres in painful tendinosis and ruptured tendon.

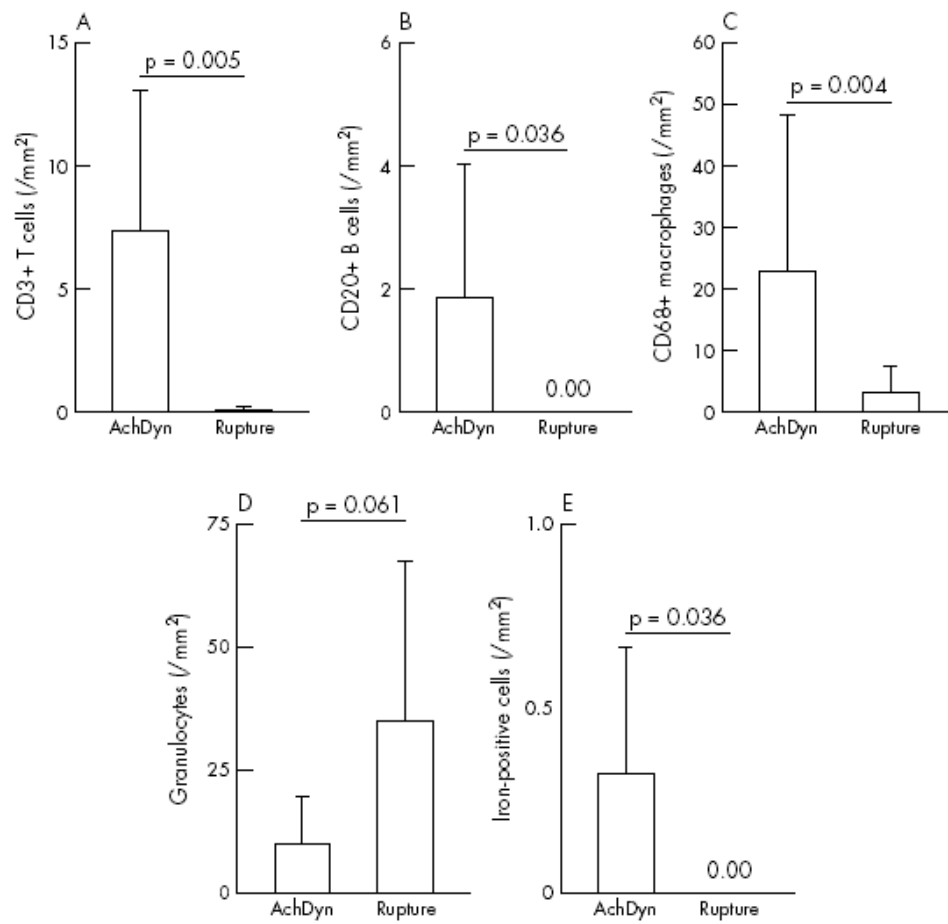
The numbers of TH-positive nerve fibres (A) and SP-positive nerve fibres (B) were determined by immunofluorescent histochemistry in 10 tendons from Achilles tendinosis patients (AchDyn) and 10 spontaneously ruptured tendons. The number of nerve fibres was averaged from 17 high power fields and expressed as the number of fibres per 1mm^2 . Box plots give the 10th, 25th, 75th, and 90th percentile. The median is given as a horizontal line within the box. Abbreviations: SP, substance P; TH, tyrosine hydroxylase (sympathetic nerve fibres).

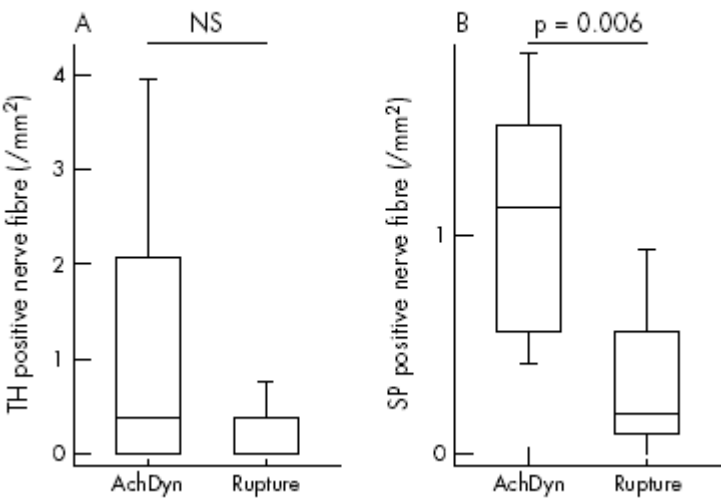
Figure 3

Histological sections of specimens from ruptured tendons and from tendinosis patients stained for substance P by immunofluorescence (SP, top row, original magnification x 400) and stained by Turnbull's acid Ferro cyanide reaction to detect hemosiderophages (Fe^{++} , bottom row, original magnification x 5). Note that there are more SP-positive nerve fibres visible in the tendinosis specimen than in the ruptured tendon. Hemosiderophages which are discernible as dark blue spots and small blood vessels were only found in the tendinosis specimen, not in the ruptured tendon.

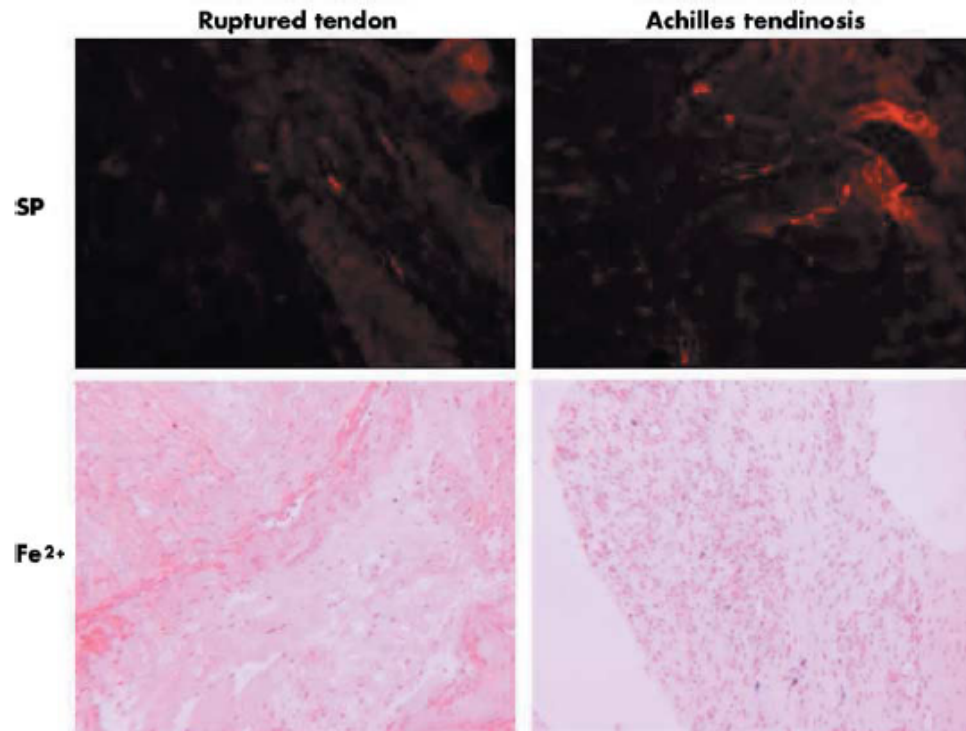
Declaration of Competing Interest

According to the questions posed in the BMJ questionnaire there is no competing interest regarding the content of this article.





Schubert et. al., Fig. 3



Dupuytren's contracture is associated with sprouting of SP-positive nerve fibers and infiltration by mast cells

Thomas E. O. Schubert¹MD, Claudia Weidler²Bsc, Nicola Borisch³ MD, Christin Schubert¹, Ferdinand Hofstädter¹MD, and Rainer H. Straub² MD

¹Department of Pathology, University of Regensburg, Regensburg, Germany

²Department of Internal Medicine I, University of Regensburg, Regensburg, Germany

³Department of Orthopedic Surgery, University of Regensburg, Bad Abbach, Germany

Running title: Dupuytren and mast cells

Corresponding author:

Thomas E.O. Schubert, Department of Pathology, University of Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany

Telephone: 0049-941-9446606, FAX: 0049-941-9446602

Email address: thomas.schubert@klinik.uni-regensburg.de

Supported by the DFG (Str 511/10-1) and the University of Regensburg funding program ReForM C

ABSTRACT

Objective: To characterize inflammatory elements such as nerve fibers and mast cells in palmar fascias affected by Dupuytren's contracture.

Methods. We compared 10 normal palmar fascia specimens from patients undergoing carpal tunnel decompression with 20 samples from patients undergoing fasciectomy for Dupuytren's contracture by means of immunohistochemistry.

Results: Increased numbers of mast cells were observed in Dupuytren's contracture.

Mast cells were frequently found in the center and periphery of the fibrous nodules.

The increased numbers of mast cells were associated with an increased density of nociceptive substance P (SP)-positive nerve fibers. Dupuytren's contracture tissue and control tissue was devoid of sympathetic nerve fibers.

Conclusion: Inflammatory infiltration by mast cells was associated with sprouting of nociceptive nerve fibers. This may be important in the pathogenesis of Dupuytren's contracture. Nerve-mast cell interaction may contribute to the release of fibrogenic cytokines and growth factors.

INTRODUCTION

Dupuytren's contracture is a benign proliferative disease of connective tissue. It is characterized by an abnormal fibroblast proliferation and matrix deposition affecting the palmar fascia. It most commonly occurs in Caucasians and is particularly prevalent among persons of northern European origin¹. There is evidence of genetic predisposition, however, the precise etiology remains unclear¹.

The earliest clinical manifestations of Dupuytren's contracture are thickening and tethering of the palmar skin which are followed by fibrotic and nodular changes in the palmar aponeurosis producing the characteristic digital flexion deformity.

Several theories have been proposed to explain the pathogenesis of Dupuytren's contracture. It has traditionally been viewed as a benign neoplastic process, however, cytogenetic studies are contradictory and do not unequivocally support the classification of Dupuytren's contracture as a clonal proliferation^{2;3}. According to a second theory, narrowed micro-vessels found in diseased fascia tissue were held to result in localized ischemia eliciting repair mechanisms and formation of nodular proliferations⁴. Inflammatory infiltration of palmar tissue from Dupuytren's contracture has been reported by several authors who concluded that Dupuytren's contracture may be a chronic inflammatory disease⁵⁻⁸.

Mast cells are frequently found in conditions associated with organisation such as wound healing, scars and chronic inflammations^{9;10}. Additionally, they are thought to play a role in angiogenesis¹¹. Nociceptive nerve fibers sprout into inflamed tissues and wound areas. Substance P (SP) secreted by nociceptive nerve fibers can induce degranulation of mast cells and liberate various potentially fibrogenic factors¹².

Neither the content of mast cells nor the density of SP-positive nerve fibers in tissue from Dupuytren's contracture are known. We compared specimens from normal

palmar fascia and fascia affected by Dupuytren's contracture with regard to mast cell content and sprouting of nociceptive and sympathetic nerve fibers in order to analyze whether Dupuytren's contracture is an inflammatory condition.

MATERIAL AND METHODS

Tissue for analysis was obtained from sixteen male and four female patients undergoing fasciectomy for Dupuytren's contracture of the hand (age range 48 to 78 years). Patients suffering from diabetes or alcoholism were excluded from the study. Unaffected connective tissue was obtained from palmar fascia excised during surgery for carpal tunnel decompression. Seven patients were male and three female (age range 37 to 73 years). The specimens had been submitted to the department of Pathology between July 2003 and February 2004 for routine histological examination.

Immunohistochemistry of mast cells. Formalin fixed tissue was dehydrated and embedded in paraffin. Paraffin sections 3 to 5 μm thick were mounted on "Superfrost Plus" slides, heated for 20 minutes at 72°C, deparaffinized and rehydrated. Sections were placed in a microwave for 30 minutes at 240 W in a citrate buffer at pH=7,3, then cooled to room temperature. Following antigen retrieval, the slides were rinsed, endogenous peroxidase activity was blocked by using methanolic peroxide, the slides were rinsed again, and primary monoclonal antibody against c-kit, LCA or S100 (DAKO, Hamburg, Germany) in a dilution of 1:100 was applied. All slides were incubated using a Ventana machine and each antibody incubation was performed at 37°C and the labeled Streptavidin-biotin-peroxidase method at 37°C was used to

visualize positive reactions (Ventana Medical Systems basic DAB detection kit, Ventana Medical Systems Inc., USA). A dark brown surface precipitate was evaluated as positive reaction. Sections incubated without primary antibody had no detectable immunoreactivity. In order to detect mast cells by a second method paraffin sections were stained by Giemsa stain.

The numbers of mast cells, LCA-positive cells and S100-positive dendritic cells were evaluated in 10 randomly selected high power fields of view (400x) and expressed per square millimeter.

Immunohistochemistry of nerve fibers. The paraffin embedded samples were cut into 5 μm thick sections and dried overnight at 37°C. Deparaffination and antigen retrieval were done as described above. The determination of the substance P (SP) positive sensory nerve fibers and sympathetic tyrosine hydroxylase (TH) positive nerve fibers has been described previously (13). Briefly, 3 to 6 sections were used for immunohistochemical evaluation. After blocking, the sections were incubated overnight with primary antibodies against TH or SP (Chemicon, Temecula, CA, USA). Immunofluorescent staining was achieved using Alexa 546 conjugated secondary antibodies against mouse or rabbit IgG (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). The numbers of TH- and SP-positive nerve fibers were evaluated in 17 randomly selected high power fields of view (400x) and expressed per square millimeter.

Statistical analysis. Individual values were compared by Mann-Whitney test (SPSS V.11.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Correlations were analyzed using Spearman rank correlation analysis (SPSS). A p-value below 0.05 was the significance level.

RESULTS

We compared 10 specimens from normal palmar fascia with 20 specimens from fascias affected by Dupuytren's contracture. We found a twelve-fold increase of the number of mast cells in Dupuytren's contracture as compared to normal fascia tissue (Fig.1a). Mast cells were frequently found in the centre or in the periphery of fibrous nodules and in the adjacent fat tissue next to small vessels and eccrine sweat glands. Sweat glands and Pacinian corpuscles were often surrounded by fibrous proliferations. Sweat glands within or near the nodules showed inflammatory infiltration in some cases whereas Pacinian corpuscles were never associated with inflammation. The increase in mast cell numbers was accompanied by an increased density of SP-positive nerve fibers in Dupuytren's contracture (Fig. 1a, Fig. 2). Tissue from both normal palmar fascia and fascia affected by Dupuytren's contracture was devoid of TH-positive nerve fibers (data not shown). In a correlation analysis in patients with Dupuytren's contracture, the number of mast cells was positively correlated with the number of SP-positive nerve fibers (Fig. 1b, Fig. 2.). In 13 Dupuytren samples small lymphocytic infiltrations were found in subcutaneous tissue next to the nodules. LCA and S100-positive dendritic cells were only found occasionally within the nodules. The numbers ranged from 2 to 7 cell per 10 high power fields for LCA-positive cells and from 0 to 4 for S100-positive Langerhans cells. Control tissue contained 0 to 2 LCA- positive cells and 0 to 1 S100-positive Langerhans cells (data not shown).

DISCUSSION

Dupuytren's disease is a superficial fibromatosis that is characterized by the development of fibrotic nodules and cords in the palmar and digital fascia. Although the diseased tissue possesses features of a benign neoplastic process, cytogenetic studies are contradictory and do not unequivocally support the classification of Dupuytren's contracture as a clonal fibroblastic proliferation^{2,3}.

Proliferation of fibroblasts and formation of fibrotic tissue can be observed in wound repair and chronic inflammatory conditions. The proliferation of fibroblasts in these instances is mediated by various cytokines released by macrophages, lymphocytes and mast cells¹⁴. An increased expression for mRNA of the proinflammatory cytokines interleukin-1 α , interleukin-1 β , transforming growth factor β and basic fibroblast growth factor in palmar fascias potentially mediating fibroblast proliferation was observed in Dupuytren's contracture¹⁵. This finding is mirrored in the presence of inflammatory cells in fascia affected by Dupuytren's contracture⁵⁻⁸. Different types of leukocytes such as CD3-positive lymphocytes⁵, macrophages¹⁶ were observed in the diseased tissue. Increased numbers of Langerhans cells and CD45-positive leukocytes were found both in nodules and at dermo-epidermal junctions above the palmar fascia⁶. In some studies, topical steroid application was shown to elicit apoptosis of fibroblasts and inflammatory cells and induced regression of fibrotic nodules of contracted fascias^{17,18}.

Although mast cells can be found in fibrosing processes such as scars, healing wounds and in inflammatory conditions^{9,19,20} their presence in fascias affected by Dupuytren's contracture has not been described. Mast cells are known to be a source of several fibrogenic mediators such as platelet derived growth factor, transforming growth factor- β and basic fibroblast growth factor²¹ that can be released upon stimulation of mast cells. Mast cell degranulation can be elicited by substance P released from nociceptive nerve fibers¹². Nociceptive nerve fibers sprout into

inflamed tissues and wounds^{13;22}. We found that both the number of mast cells and of SP-positive nerve fibers are strongly increased in Dupuytren's contracture as opposed to normal fascia tissue. Mast cells outnumber the LCA-positive inflammatory cells and S100-positive Langerhans cells within the fibrotic tissue. These findings support the hypothesis that Dupuytren's contracture is an inflammatory process. Both mast cells and nociceptive nerve fibers are able to contribute to the proliferation of fibroblasts on their own and in a coordinated fashion. Degranulation of mast cells and production of fibrogenic cytokines by mast cells may be induced by release of substance P from the increased numbers of nociceptive nerve fibers found in fascia tissue affected by Dupuytren's contracture. Additionally, the sprouting of sensory nerve fibers themselves may have profound effects on fascia tissue since it has been demonstrated that SP stimulates the proliferation of fibroblasts²³ and the production of TGF β by fibroblasts²⁴. SP released by nociceptive nerve fibers may have a direct effect on the fibroblasts of the palmar fascia contributing to the formation of fibrotic nodules. A strikingly similar inflammatory condition termed interstitial cystitis can take place in the urinary bladder of middle aged Caucasian women²⁵. It is characterized by fibrosis of the bladder wall, a mast cell rich inflammation and sprouting of SP-positive nerve fibers²⁵. However, the fibrosis in interstitial cystitis does not evoke the macroscopic impression of a tumor. The tumor-like features of Dupuytren's contracture are rooted in distinct anatomic features of the palmar fascia such as the superficial location and the inconspicuous nature of the normal fascia. Both features promote the perception of a proliferating alteration of the fascia as a nodule or tumour. In other organs, however, diffuse fibroblastic proliferations are rather classified as fibrosis or scarring as in the case of interstitial cystitis.

In summary, our study has demonstrated increased numbers of mast cells and SP-positive nerve fibers in Dupuytren's contracture presenting new evidence for an inflammatory pathogenesis of Dupuytren's contracture.

Reference List

- (1) Saar JD, Grothaus PC. Dupuytren's disease: an overview. *Plast Reconstr Surg* 2000; 106(1):125-134.
- (2) Wurster-Hill DH, Brown F, Park JP, Gibson SH. Cytogenetic studies in Dupuytren contracture. *Am J Hum Genet* 1988; 43(3):285-292.
- (3) Casalone R, Mazzola D, Meroni E, Righi R, Minelli E, Granata P et al. Cytogenetic and interphase cytogenetic analyses reveal chromosome instability but no clonal trisomy 8 in Dupuytren contracture. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 99(1):73-76.
- (4) Hueston JT, Murrell GA. Cell-controlling factors in Dupuytren's contracture. *Ann Chir Main Memb Super* 1990; 9(2):135-137.
- (5) Baird KS, Alwan WH, Crossan JF, Wojciak B. T-cell-mediated response in Dupuytren's disease. *Lancet* 1993; 341(8861):1622-1623.
- (6) Qureshi FI, Hornigold R, Spencer JD, Hall SM. Langerhans cells in Dupuytren's contracture. *J Hand Surg [Br]* 2001; 26(4):362-367.
- (7) Meek RM, McLellan S, Crossan JF. Dupuytren's disease. A model for the mechanism of fibrosis and its modulation by steroids. *J Bone Joint Surg Br* 1999; 81(4):732-738.
- (8) Gudmundsson KG, Arngrimsson R, Arinbjarnarson S, Olafsson A, Jonsson T. T- and B-lymphocyte subsets in patients with Dupuytren's disease. Correlations with disease severity. *J Hand Surg [Br]* 1998; 23(6):724-727.
- (9) Beer TW, Baldwin H, West L, Gallagher PJ, Wright DH. Mast cells in pathological and surgical scars. *Br J Ophthalmol* 1998; 82(6):691-694.
- (10) Egozi EI, Ferreira AM, Burns AL, Gamelli RL, Dipietro LA. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound Repair Regen* 2003; 11(1):46-54.
- (11) Hiromatsu Y, Toda S. Mast cells and angiogenesis. *Microsc Res Tech* 2003; 60(1):64-69.
- (12) Mori N, Suzuki R, Furuno T, McKay DM, Wada M, Teshima R et al. Nerve-mast cell (RBL) interaction: RBL membrane ruffling occurs at the contact site with an activated neurite. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283(6):C1738-C1744.
- (13) Miller LE, Justen HP, Scholmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 2000; 14(13):2097-2107.
- (14) Jeschke MG, Schubert T, Klein D. Exogenous liposomal IGF-I cDNA gene transfer leads to endogenous cellular and physiological responses in an acute wound. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286(5):R958-R966.
- (15) Baird KS, Crossan JF, Ralston SH. Abnormal growth factor and cytokine expression in Dupuytren's contracture. *J Clin Pathol* 1993; 46(5):425-428.

- (16) Andrew JG, Andrew SM, Ash A, Turner B. An investigation into the role of inflammatory cells in Dupuytren's disease. *J Hand Surg [Br]* 1991; 16(3):267-271.
- (17) Meek RM, McLellan S, Reilly J, Crossan JF. The effect of steroids on Dupuytren's disease: role of programmed cell death. *J Hand Surg [Br]* 2002; 27(3):270-273.
- (18) Shelley WB, Shelley ED. Response of Dupuytren's contracture to high-potency topical steroid. *Lancet* 1993; 342(8867):366.
- (19) Hermes B, Welker P, Feldmann-Boddeker I, Kruger-Krasagakis S, Hartmann K, Zuberbier T et al. Expression of mast cell growth modulating and chemotactic factors and their receptors in human cutaneous scars. *J Invest Dermatol* 2001; 116(3):387-393.
- (20) Marshall JS, King CA, McCurdy JD. Mast cell cytokine and chemokine responses to bacterial and viral infection. *Curr Pharm Des* 2003; 9(1):11-24.
- (21) Li CY, Baek JY. Mastocytosis and fibrosis: role of cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127(2):123-126.
- (22) Kishimoto S. The regeneration of substance P-containing nerve fibers in the process of burn wound healing in the guinea pig skin. *J Invest Dermatol* 1984; 83(3):219-223.
- (23) Katayama I, Nishioka K. Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation: possible involvement of neuropeptide in tissue fibrosis. *J Dermatol Sci* 1997; 15(3):201-206.
- (24) Lai XN, Wang ZG, Zhu JM, Wang LL. Effect of substance P on gene expression of transforming growth factor beta-1 and its receptors in rat's fibroblasts. *Chin J Traumatol* 2003; 6(6):350-354.
- (25) Selo-Ojeme DO, Onwude JL. Interstitial cystitis. *J Obstet Gynaecol* 2004; 24(3):216-225.

Figure 1

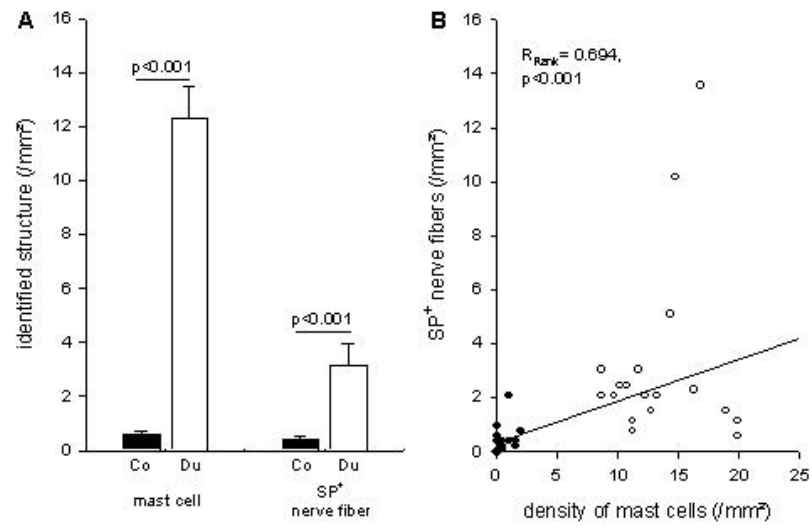
Determination of mast cells and nociceptive nerve fibers in normal palmar fascia tissue and fascia tissue affected by Dupuytren's disease.

The numbers of (A) mast cells and nociceptive nerve fibers were determined by immunohistochemistry in 10 control specimens and 20 specimens affected by Dupuytren's contracture.

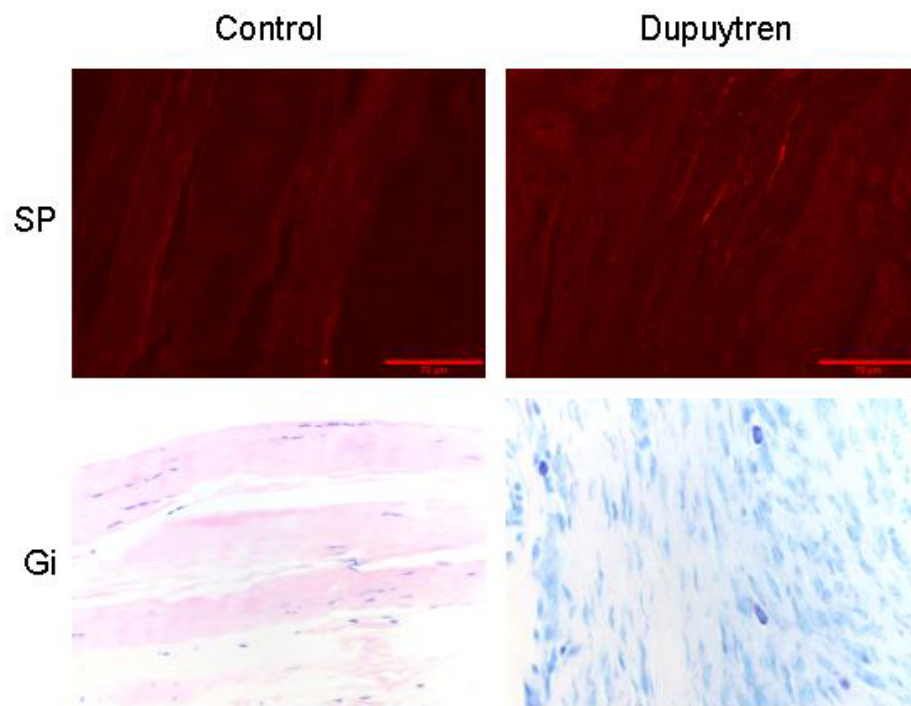
Correlation of density of mast cells and nociceptive nerve fibers (B) in control specimens (black dots) and palmar fascia tissue affected by Dupuytren's contracture (open circles). The linear regression line, the Spearman rank correlation coefficient, and its p-value are given in the panels.

Figure 2

Histological sections of specimens from control specimens and palmar fascia tissue affected by Dupuytren's contracture stained for substance P by immunofluorescence (SP, top row, original magnification x 400) and stained by Giemsa to detect mast cells (Gi, bottom row, original magnification x 400). Note that there are SP-positive nerve fibers visible only in the Dupuytren specimen. Mast cells that are discernible as cells containing metachromatic, dark blue granules were more frequent in Dupuytren specimens. They were often located deep within the nodules or next to small blood vessels.



Schubert et al, Fig. 2



7.2 Weitere Publikationen

- Härle P, Pongratz G, Weidler C, Büttner R, Schölmerich J, Straub RH: Possible role of leptin in hypoandrogenicity in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63:809-816.
- Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Schölmerich J, Straub RH: Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:1156-1163.
- Straub RH, Weidler C, Demmel B, Herrmann M, Kees, F, Schmidt M, Schölmerich J, Schedel J: Renal clearance and daily excretion of cortisol and adrenal androgens in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63:961-968.
- Weidler C, Kröll R, Miller LE, Schölmerich J, Grifka J, Straub RH: Low density of CD1+ cells in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2004; 22:433-440.
- Weidler C, Schaumburger J, Miller LE, Schölmerich J, Straub RH: Synovial density of frizzled 5 – positive cells does not differ between patients with RA and OA and is independent of inflammation. *J Rheumatol.* 2004; 31:1874-1875.

Danksagung

Frau Prof. Dr. med. Katja Becker-Brandenburg danke ich für die Bereitschaft, die fakultätsinterne Betreuung und Vertretung dieser Arbeit zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Rainer H. Straub für die hervorragende und engagierte Betreuung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich danke ich für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit.

Für die gute Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie in Jena und der Klinik für Orthopädie in Bad Abbach möchte ich mich besonders bei Dr. rer. nat. Martin Schmidt, Dr. rer. nat. Heidrun Naumann, Prof. Dr. med. Joachim Grifka und Dr. med. Raphael Hofbauer bedanken.

Den Kolleginnen und Kollegen aus meiner Arbeitsgruppe möchte ich besonders danken. Bei Elke Lorenz, Angelika Gräber und Melanie Grünbeck möchte ich mich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und die allzeit gute Stimmung im Labor bedanken. Dr. rer. nat. Luitpold Miller möchte ich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten danken. Dr. rer. nat. Lars Jurzik danke ich herzlich für sehr viele hilfreiche Gespräche und methodische Tipps während mancher Frustrationskrisen. Für die stete Bereitschaft, meine klinischen Fragen zu beantworten und seine methodischen Hilfestellungen danke ich Dr. med. Peter Härle. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich beim Team des Forschungsbaus für die freundliche Aufnahme, das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für den Rückhalt und die Unterstützung während meines Studiums und meiner Dissertation.

Meinem Lebensgefährten Markus Leinberger danke ich für sein immer offenes Ohr, sich meine Sorgen und Nöte anzuhören und seine Hilfe bei computertechnischen Fragen.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Regensburg, den 09.02.2005

Claudia Weidler